

# 血液クモ膜関門・血液脳脊髄液関門・血液網膜関門 輸送担体のタンパク質定量的解析に基づく機能評価 及び血液クモ膜関門における有機アニオン系輸送担 体の機能解明

著者	張 正宇
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第18046号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00122560">http://hdl.handle.net/10097/00122560</a>

血液クモ膜関門・血液脳脊髄液関門・血液網膜関門輸送担体  
のタンパク質定量的解析に基づく機能評価及び血液クモ膜  
関門における有機アニオン系輸送担体の機能解明

平成 29 年度

東北大学大学院薬学研究科

生命薬科学専攻

張 正宇

略語表

BAB	Blood arachnoid barrier
BBB	Blood brain barrier
BCRP/Bcrp	Breast cancer resistance protein
BCSFB	Blood-cerebrospinal fluid barrier
BSA	Albumin from bovine serum
BSCB	Blood spinal cord barrier
CRT1/Crt1	Creatine transporter 1
CSF	Cerebrospinal fluid
DTT	Dithiothreitol
HVA	Homovanillic acid
IAA	Iodoacetamide
Inner BRB	Inner blood retina barrier
Lys-C	Lysyl Endopeptidase
MATE1	Multidrug and toxin extrusion protein 1
MCT/Mct	Monocarboxylate transporter
MDR1/Mdr1a	Multidrug resistance protein 1
MRP/Mrp	Multidrug resistance-associated protein
OAT/Oat	Organic anion transporter
OATP/Oatp	Organic anion transporting polypeptide
Outer BRB	Outer blood retina barrier
PAH	<i>Para</i> -aminohippuric acid
PEPT2/Pept2	Peptide transporter 2
RPE	Retina pigment epithelium

SMVT

Sodium dependent multivitamin transporter

## 目次

第1章 緒言.....	1
第1節 脳脊髄液中薬物動態における脳脊髄液と接する関門の役割： 脈絡叢上皮細胞、クモ膜上皮細胞、脊髄毛細血管内皮細胞における 細胞膜輸送.....	1
第2節 血液網膜関門輸送研究の現状と課題.....	15
第3節 LC-MS/MS に基づく標的絶対定量プロテオミクスによるタンパク質 定量法の有用性.....	17
第4節 本研究の目的.....	19
第2章 標的定量絶対プロテオミクスに基づくラット及びヒト血液脳脊髄液関 門輸送担体のタンパク質発現量の解明.....	20
第1節 序論.....	20
第2節 ラット脈絡叢細胞膜画分における輸送担体発現量解析.....	22
第3節 ラット及びヒト脈絡叢細胞膜画分における輸送担体発現量比較.....	23
第4節 考察.....	28
第3章 標的絶対定量プロテオミクスに基づくラット血液クモ膜関門輸送担体 タンパク質発現量の解明及び有機アニオン系輸送担体に着目した機能 解析.....	38
第1節 序論.....	38
第2節 ラット軟髄膜細胞膜画分における輸送担体タンパク質発現量解析..	39
第3節 ラット軟髄膜及び脈絡叢における輸送担体タンパク質発現量比較 解析.....	40
第4節 脳室内投与、大槽内投与後 rhodamine 123 の脳室内及びクモ膜下腔 CSF 中の分布.....	48

第5節	大槽内投与法を用いたパラアミノ馬尿酸 (PAH)のCSFからの排出..	52
第6節	免疫染色及び Western blotting 法を用いた oat1 の発現及び局在解析..	56
第7節	考察.....	58
第4章	ブタ内側血液網膜関門における輸送担体タンパク質発現量解析及び外側血液網膜関門、血液脳関門、血液脳脊髄液関門との比較解析.....	64
第1節	序論.....	64
第2節	ブタ inner BRB 粗膜画分における輸送担体タンパク質発現量解析...	66
第3節	ブタ inner BRB と outer BRB, BBB 及び BCSFB の比較解析.....	67
第4節	考察.....	74
第5章	結論及び展望.....	84
第6章	試薬及び実験方法.....	88
参考文献		
発表論文		
謝辞		

## 第1章 緒言

### 第1節 脳脊髄液中薬物動態における脳脊髄液と接する関門の役割：脈絡叢上皮細胞、クモ膜上皮細胞、脊髄毛細血管内皮細胞における細胞膜輸送

#### 脳脊髄液の産生・吸収に関する従来の仮説及び最新の知見

脳室及びクモ膜下腔を充満する脳脊髄液 (cerebrospinal fluid; CSF)は、①脳・脊髄・神経に対する浮力効果、②頭蓋脊髄腔におけるvolume adjustment、③栄養素の運搬、④タンパク質やペプチドの輸送、⑤浸透圧の調整による脳容積の調節、⑥外力に対する緩衝、⑦薬物輸送、⑧免疫系のコントロール、⑨代謝産物や老廃物の排出、⑩代謝熱の持ち去りによるcooling 効果などの役割を担い、中枢神経系の恒常性を維持する重要な役割を果たしている (Matsumae et al., 2016)。約100年前、CushingはCSFの動態を「第3の循環 (the third circulation)」とし、“bulk flow”説という概念を提唱した。Bulk flow説は以下の3つの命題から構成されており (Cushing, 1969; Cushing, 1914; Weed, 1914)、現在まで広く信じられている。

- 1) CSFは主に脈絡叢で産生される
- 2) CSFは主に頭頂部の上矢状静脈洞に存在するクモ膜顆粒で吸収される
- 3) CSFは一定方向に向かって循環しており (bulk flow), 側脳室から第三脳室, 中脳水道, 第四脳室を通過して, マジャンディ孔およびルシュカ孔からクモ膜下腔に出て, 脳表のクモ膜下腔を頭頂部に向かって上行し, 最終的には上矢状静脈洞のクモ膜顆粒から吸収される。

一方、臨床において従来のbulk flow説では説明が難しい事象も存在していることから、これまで教義として受け入れられてきたCSF動態の概念について再考する時が来ているかもしれない。

#### 脳脊髄液の産生部位について

CSFの産生部位は主に脈絡叢であるとされてきた。脈絡叢は脳室内部に存在し有窓性の毛細血管に富んだ絨毛で構成され、その表面は密着結合を形成した上皮細胞で覆われており、このような特異的な組織構造からCSFの産生部位として考えられてきた。しかし、実験的に脈絡叢を摘出した動物においてCSF産生は正常の70%に維持されていることや、脈絡叢切除術後の患者でも産生量が正常者と同程度であることが報告されていることなどから (Milhorat et al., 1971; Milhorat et al., 1976; Milhorat et al., 1976)、CSFの産生は脈絡叢だけではないと考えられる。中脳水道完全閉塞モデルでも頭蓋内圧は上昇せず、脳室拡大もなかったことや (Orešković et al., 2010)、脳表において、クモ膜下腔と脳 (脳間質液, interstitial fluid; ISF)間には密着結合を形成しない軟膜によって隔てられていることから、CSFとISF間には水交換が可能と考えられる (Alcolado et al., 1988; Orešković et al., 2010)。近年、Oreškovićらは新たに毛細血管説 (capillary theory)を提唱し、CSFとISFを一体のものとして考え、「脳脊髄液の産生と吸収は中枢神経系の毛細血管壁で行われ、他臓器と同様に、静水圧差によって水が組織に出て、浸透圧差によって吸収される」としている。ヒト脈絡叢の表面積は約 $0.02 \text{ m}^2$ であるのに対し脳毛細血管の内皮細胞の表面積は約 $22 \text{ m}^2$ に達しており、CSFの産生が表面積が限られている脈絡叢のみで行っているかを考えると毛細血管説は有用であると考えられる。

#### 脳脊髄液の吸収部位について

CSFの吸収部位はWeedらによってクモ膜顆粒であると確立された (Weed, 1914)。しかし、その報告においては正常圧で注入した墨汁はくも膜顆粒には集まらず、生物が致死的なほどの高圧で注入して初めてくも膜顆粒に墨汁を認めたとされおり (Weed, 1914)、正常時ではクモ膜顆粒以外の吸収部位が存在することが示唆された。近年、多くの動物においてCSF中に投与した色素がクモ膜顆



粒ではなく、深頸部リンパ節に集積することが報告されており (Johnston et al., 2004)、ヒトにおいてもクモ膜下腔-篩板-鼻粘膜下組織のリンパ管-頸部リンパ節というCSF吸収経路が確認されている (Johnston et al., 2004)。また、脳実質内に注入したトレーサーは頭蓋底部の動脈周囲多く集積し、最終的には頸部リンパ節に到達することから、ISFがリンパ節に排出される脳リンパ液経路 (brain lymphatic drainage)の存在も提唱されている (Weller et al., 2010)。クモ膜下腔のCSFが動脈周囲腔から脳実質へはflowがあることから (Iliff et al., 2012)、CSF-ISF-頸部リンパ節という経路もCSFの吸収経路の一つとしても考えられる。

上述のように、CSF-ISF間では水交換が可能であり、脈絡叢やクモ膜顆粒以外の産生・吸収部位についても新たな概念が提唱されていることから、これまで脈絡叢で産生され、クモ膜顆粒によって吸収される一方方向の流れのみを想定しているCSFのbulk flow説については再考を迫られている。

#### 脳脊髄液中薬物動態を解明する意義

CSFは中枢 (CNS)に直接接している極めて重要な生体液である。CSF中の薬物動態を解明することは細菌性髄膜炎をはじめとするCSF疾患において薬効の予測につながるだけでなく、脳内の薬物動態解明にもつながる。上述のようにCSF-ISF間の軟膜は密着結合を形成しておらず、水や物質交換が生じうると考えられ (Iliff et al., 2012)、また近年では睡眠時クモ膜下腔のCSFの脳内への流入量が増大することが報告されており (Xie et al., 2013)、CSF中の薬物動態は脳内薬物動態にも影響しうる重要なファクターであると考えられる。従って、脳内の薬物動態を解明するうえで、CSFにおける薬物動態の制御機構を明らかにすることが必須と考える。

## 血液脳脊髄液関門輸送担体研究の歴史的背景

側脳室、第3脳室および第4脳室に存在する脈絡叢は、CSFの主な産生場所として考えられてきた。脈絡叢は一層の上皮細胞及び有窓性の毛細血管から構成されており、密着結合を形成する脈絡叢の上皮細胞を実体とする血液脳脊髄液関門 (Blood-cerebrospinal fluid barrier; BCSFB)は循環血液及びCSF間の物質交換を制限している (Figure 1-1)。このことからBCSFBを介した物質交換は主に脈絡叢上皮細胞の細胞膜を介した経細胞経路のよって行われる。これまでの数十年のBCSFB研究において、RT-PCRや免疫染色、western blottingなどの手法を用いて、BCSFBにおける輸送担体の発現解析が行われ、脈絡叢の上皮細胞は微絨毛構造を有する脳脊髄液側 (CSF側)及び血管側 (blood側)に分かれており、両側にはそれぞれ異なった輸送担体発現プロファイルを有していることが明らかとなった (Redzic, 2011)。また、BCSFBにおける細胞膜上の輸送担体の輸送機能を評価するために、*in vitro*においては初代培養の脈絡叢上皮細胞や条件的不死化ラット脈絡叢上皮細胞株 (TR-CSFB)を用いた解析 (Crook et al., 1981; Kitazawa et al., 2000; Ohtsuki et al., 2003; Hosoya et al., 2004)、*in vivo*において、標的輸送担体の特異的な基質を用いた脳室内投与、静脈内投与、単離脈絡叢での取込実験や(Mens et al., 1983; Scism et al., 1997; Tochino and Schanker, 1965)、標的輸送担体の knockout mouseを用いた解析が行われ、BCSFBの輸送担体介した輸送システムがCSF中の薬物動態を制御していると考えられてきた。Table 1-1 はBCSFBについて、1)輸送担体名、2)代表的基質、3)細胞膜局在性、4)輸送の方向性を整理したものである。

MDR1とBCRPは、血液脳関門(Blood-Brain Barrier, BBB)の実体である脳毛細血管内皮細胞において血液側の細胞膜に発現しており、異物を脳から血液方向へ

排出する解毒機構として最も重要な役割を担う。一方、BCSFBではMDR1とBCRPはCSF側細胞膜に発現しており(Rao et al., 1999; Tachikawa et al., 2005)、異物を脊髄液方向へ供給する役割を担う。Mdr1a, bcrpのノックアウトマウスに基質であるtopotecanを静脈内投与すると脳脊髄液中濃度は低下し、脳実質組織内濃度は増加することが証明されており(Shen et al., 2010)、脈絡叢に発現するMDR1, BCRPは脳脊髄液にとって異物解毒の役割を果たしていない。炎症や自己免疫疾患に使われるglucocorticoidはMDR1によって排出されることから(Uhr et al., 2002; Mason et al., 2008)、脊髄液中への供給の役割を担っているかもしれない。一方、脈絡叢上皮細胞が異物を排出することで生き残って、最低限の物質輸送の機能を維持できるように働いているのかもしれない。

MRP1は脈絡叢上皮細胞においてblood側膜に発現し(Rao et al., 1999)、基質を血液中へ排出する役割を有している。その発現はBBBにおいて定量限界以下であり(Uchida et al., 2011; Hoshi et al., 2013)、BCSFB特有の排出経路であると考えられる。MRP1は、anthracycline系の抗がん剤やvinblastine, paclitaxel, irinotecanなどの抗がん剤、ritonavirなどの抗ウイルス薬、aflatoxin B1, methoxychlorなどの毒物、薬物のglutathioneやglucuronideの抱合体を排出することから(Deeley et al., 2006)、MRP1は脳脊髄液にとって異物解毒機構として重要な役割を果たしていると考えられる。さらにleukotriene C4, bilirubin, folic acid, L-leucovorin, estrone-3-sulfateなどの内因性物質を排出することも知られており(Deeley et al., 2006)、生理的にも重要な役割を果たしていると考えられる。

OAT3/oat3は脈絡叢上皮細胞のCSF側膜に発現し、睡眠の促進因子であるprostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>)や神経炎症を引き起こす可能性のあるprostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)をはじめとする内因性の有機アニオン性化合物の脳脊髄液からの排出を担っており、CNSにおいて生理的に重要な働きをする輸送担体とされている

(Tachikawa et al., 2012; Tachikawa et al., 2012)。また、細菌性髄膜炎の治療薬として用いられているbenzylpenicillinやcefotaximeをはじめとする $\beta$ -ラクタム系やセファム系抗生物質を輸送することが知られており (Nagata et al., 2002; Yee et al., 2013; Burckhardt et al., 2012)、異物排出機構としても重要な役割を果たしていると考えられる。ProbenecidはOAT3の阻害剤であり、髄膜炎治療の際に $\beta$ -ラクタム系抗生物質とprobenecidを併用することで治療効果が増大することが知られていたが (Dacey et al., 1974)、腎臓からの排泄阻害による血中滞留性の上昇の他、BCSFBのOAT3を介した排出阻害による協奏的な作用によるものと考えられる。脈絡叢上皮細胞の血管側膜に発現するMRP4/mrp4は、脈絡叢上皮細胞内に取り込まれた種々の内因性物質やtopotecanなどの薬物の血液への排出に寄与している (Leggas et al., 2004; Tachikawa et al., 2014; Ci et al., 2007; Uchida et al., 2007)。また、MRP4/mrp4はしばしばOAT3/oat3と基質が共通していることから、OAT3/oat3が内因性物質や異物を脳脊髄液から脈絡叢上皮細胞内へ、MRP4/mrp4はそれらの物質を脈絡叢上皮細胞内から血液へと協調的に脳脊髄液からの有機アニオン性物質の排出を担うと考えられる。

Pept2は、脈絡叢上皮細胞のCSF側膜に発現し、glycylsarcosine (Glysar), carnosine, cefadroxilや5-Aminolevulinic acid (5-ALA) などのsmall oligopeptides (2-3 amino acids)の脳脊髄液から排出する (Shen et al., 2004; Ocheltree et al., 2004; Teuscher et al., 2001; Chen et al., 2017)。また、pept2 knockout miceにL-kyotorphin (内因性鎮痛性dipeptide)を脳室内投与すると無痛覚症の加重が見られることから、pept2はL-kyotorphinを脳脊髄液から排出する役割を担うことが示唆されている (Jiang et al., 2009)。一方、ラットBBBにおいてpept2の発現はみられず(Shen et al., 2004)、pept2の機能不全は脳実質への基質分布に影響する可能性が考えられるが、脳室内投与した $[^{14}\text{C}]$ Glysarの脳実質への分布は脳室周辺のみに限局していることか

ら (Smith et al., 2011)、BCSFBにおけるpept2は主にCSF中のsmall oligopeptidesの濃度制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

甲状腺ホルモンは細胞の成長や代謝だけでなく中枢の発達においても重要であり、甲状腺から分泌され血液を介して中枢へ供給される。甲状腺ホルモンの輸送担体にはMCT8とOATP1C1/OATP14が報告されている(Friesema et al., 2003; Pizzagalli et al., 2002)。ラットにおいて、mct8がCSF側に、oatp1c1は両側に発現しているのに対し (Roberts et al., 2008)、ヒトにおいてはラットと異なり、MCT8及びOATP1C1はCSF側とblood側の両側に発現することが報告されている (Roberts et al., 2008)。

Amyloid- $\beta$  peptide ( $A\beta$ )はアルツハイマー型認知症(Alzheimer's disease; AD)脳において観察される老人斑の主要構成成分であり、その脊髄液中濃度はADの診断や治療のターゲットとなりうる。h $A\beta$ (1-40)は脊髄液から積極的に排出され、LDL receptor遺伝子ファミリーに属するLRP1, 2が関与することが示唆されている (Fujiyoshi et al., 2011)。ラット脈絡叢におけるlrp1のタンパク質発現量は3.7 fmol/ $\mu$ g proteinであり、lrp2は定量限界以下(<0.2 fmol/ $\mu$ g protein)であったことから (Fujiyoshi et al., 2011)、脳脊髄液中の $A\beta$ は主としてBCSFBのlrp1によって血液中へ排出されることが考えられる。

#### 従来の血液脳脊髄液関門研究の課題

これまで、薬物や内因性物質の静脈内投与や脳室内投与後の脳脊髄液中濃度の速度論的解析、輸送担体の特異的阻害剤による消失速度の影響解析、単離脈絡叢を用いた輸送実験、条件的不死化細胞株を用いた輸送実験、及び免疫組織学的手法を用いた輸送担体タンパク質の局在解析などによって、BCSFBの輸送機構の研究が進んできた。げっ歯類を中心に行われてきたこれらの研究は、病

態モデルや遺伝子改変動物を用いることで大きく発展してきたと言える。一方、ヒトの疾患時のBCSFBの役割を解明するという究極の課題に迫るには、機能解析研究には限界がある。そこで、関門の役割をより深く知るには機能を担うタンパク質の発現量を測定し局在性を解明する必要がある。

Table 1-1 BCFSB に発現する輸送担体

分子名	基質	脈絡叢上皮細胞における局在	輸送方向	参考文献
脂溶性薬物輸送担体				
MDR1/Mdr1a	Lipophilic drugs	脳脊髄液側膜	血液→脊髄液	1, 2, 3, 4
BCRP/Bcrp	Lipophilic drugs	脳脊髄液側膜	血液→脊髄液	4, 5
MRP1/Mrp1	Lipophilic drugs, Endo- and xenobiotics	血液側膜	脊髄液→血液	1, 6
有機アニオン輸送担体				
OAT3/Oat3	PAH, Fluorescein, PGD <sub>2</sub> , E <sub>2</sub> , Benzylpenicillin	脳脊髄液側膜	脊髄液→血液	7, 8, 9, 10
MRP4/Mrp4	Topotecan, Benzylpenicillin, PGE <sub>2</sub>	血液側膜	脊髄液→血液	11-14
Oatp1a5	E217βG, E <sub>1</sub> S, PGE <sub>2</sub>	脳脊髄液側膜	脊髄液→血液	15-17
PGT/Pgt	PGD <sub>2</sub>	脳脊髄液側膜	脊髄液→血液	7
Oatp1a4	Taurocholate, E217βG, E <sub>1</sub> S, DHEAS	血液側膜	脊髄液→血液	18, 19
OATP3A1/Oatp3a1	PGE <sub>1,2</sub> ,	両側膜	-	20, 21
有機カチオン輸送担体				
PMAT/Pmat	MPP <sup>+</sup> , Dopamine, serotonin	脳脊髄液側膜	脊髄液→血液	22, 23
OCT3/Oct3	methamphetamine (METH), Dopamine, creatineine	脳脊髄液側膜	脊髄液→血液	24
ペプチド輸送担体				
PEPT2/Pept2	Glysar, L-kyotorphin, carnosine, 5-ALA, cefadroxil	脳脊髄液側膜	脊髄液→血液	25-28
クレアチニン輸送担体				
CRT1/Crt1	Creatinine, Guanidinoacetate	脳脊髄液側膜	脊髄液→血液	29
甲状腺ホルモン輸送担体				
OATP1C1/Oatp1c1	thyroid hormone	両側膜	血液→脊髄液	30
MCT8/Mct8	thyroid hormone	脳脊髄液側膜(マウス)、 両側(ヒト)	血液→脊髄液	30
ヘキソース輸送担体				
GLUT1/Glut1	D-Glucose	血液側膜	-	31
葉酸輸送担体				
RFC1/Rfc1	folate	脳脊髄液側膜	血液→脊髄液	32
PCFT/Pcft	folate	細胞内	血液→脊髄液	33
アミノ酸輸送担体				
ATA2/Ata2	Amino acid	-	脊髄液→血液	34, 35
LAT1/Lat1	Amino acid	血液側膜	-	36

MDR1/Mdr1a: Multidrug resistance protein 1; BCRP/Bcrp: Breast cancer resistance protein; MRP1/Mrp1: Multidrug resistance-associated protein 1; OAT3/Oat3: Organic anion transporter 3; MRP4/Mrp4: Multidrug resistance-associated protein 4; Oatp1a5: Organic anion transporting polypeptide 1a5; PGT/Pgt: Prostaglandin transporter; Oatp1a4: Organic anion transporting polypeptide 1a4; OATP3A1/Oatp3a1: Organic anion transporting polypeptide 3a1; PMAT/Pmat: Plasma membrane monoamine

transporter; OCT3/Oct3: Organic cation transporter 3; PEPT2/Pept2: Peptide transporter 2; CRT1/Crt1: Creatine transporter 1; OATP1C1/Oatp1c1: Organic anion transporting polypeptide 1C1/1c1; MCT8/Mct8: Monocarboxylate transporter 8; GLUT1/Glut1: Glucose transporter 1; RFC1/Rfc1: Folate transporter 1; PCFT/Pcft: Proton-coupled folate transporter; ATA2/Ata2: Amino acid transport system A; LAT1/Lat1: L-type amino acid transporter 1.

**1.** Rao et al., 2005; **2.** Uhr et al., 2002; **3.** Mason et al., 2008; **4.** Urquhart et al., 2009; **5.** Tachikawa et al., 2005; **6.** Deeley et al., 2006; **7.** Tachikawa et al., 2012; **8.** Tachikawa et al., 2012; **9.** Nagata et al., 2002; **10.** Sweet et al., 2002; **11.** Leggas et al., 2004; **12.** Tachikawa et al., 2014; **13.** Ci et al., 2007; **14.** Uchida et al., 2007; **15.** Kusuhara et al., 2003; **16.** Ohtsuki et al., 2003; **17.** Ohtsuki et al., 2004; **18.** Gao et al., 1999; **19.** Kusuhara et al., 2005; **20.** Adachi et al., 2003; **21.** Huber et al., 2006; **22.** Duan et al., 2013; **23.** Wang et al., 2016; **24.** Nakayama et al., 2007; **25.** Shen et al., 2004; **26.** Ocheltree et al., 2004; **27.** Teuscher et al., 2000; **28.** Chen et al., 2017; **29.** Tachikawa et al., 2008; **30.** Roberts et al., 2008; **31.** Harik et al., 1990; **32.** Hinken et al., 2011; **33.** Grapp et al., 2013; **34.** Coben et al., 1971; **35.** Kitazawa et al., 2001; **36.** Roberts et al., 2008.



### CSF中薬物動態の理解には血液脳脊髄液関門だけでは不十分である

これまで、CSFの最も上流に存在する脈絡叢上皮細胞は脳脊髄液関門と呼ばれ、CSFと血液の間の薬物輸送の中心的な役割を担っていると考えられてきた。一方、構造学的にヒト及びラットにおいて脳室内のCSF体積はCSF全体積のそれぞれ15%、5%しか占めておらず、約80%のCSFは脳室から遠く離れたクモ膜下腔に存在する (Thorne et al., 2014)。脈絡叢は脳室内に存在していることから、BCSFBが全てのCSF、特にクモ膜下腔のCSF中の薬物動態をも全て制御していると断言することはできないと考える。実際、イヌにおいてドーパミンの代謝物であるホモバニリン酸 (HVA)の大槽CSF中濃度は側脳室の1/20以下であることが報告されている (Guldberg et al., 1966)。また、ヒトにおいてもmethotrexateを用いたCSF灌流後脳室及び腰クモ膜下腔CSF中におけるmethotrexate濃度が顕著に異なることも報告されている (Morikawa et al., 1998)。更に、脈絡叢上皮細胞の細胞膜輸送機能だけでCSF中の薬物動態を説明できない現象が動物実験レベルで報告されている。BCSFBではMdr1aとbcrpはCSF側細胞膜に発現しており (Rao et al., 1999; Tachikawa et al., 2005)、異物をCSF方向へ供給する役割を担う (Shen et al., 2010)。しかし、Kodairaらのmdr1a/1b(-/-)及びbcrp(-/-) knockout miceを用いた研究においてそれらの基質のCSF-to-plasma concentration ratios ( $K_{p,CSF}$ )はwild-type miceと比較して上昇したことが認められている (Kodaira et al., 2011)。特筆すべきはKodairaらの論文において、CSFはクモ膜下腔である大槽から採取されている (Kodaira et al., 2011)。これらの報告は、脈絡叢とは異なる性質を持つ未知のCSFから排出経路の存在を示唆している。

### 血液クモ膜関門について

血液クモ膜関門 (blood-arachnoid barrier; BAB)はクモ膜上皮細胞を実体とし、

CSFに直接接するもう一つの中枢関門である (Figure 1-1)。クモ膜上皮細胞は脳及び脊髄のクモ膜下腔を流れるCSFに直接面し、密着結合を形成している (Nabeshima et al., 1975)。ヒト脈絡叢の表面積は約 $0.02 \text{ m}^2$  (Dohrmann et al., 1970)であるのに対し、脳クモ膜の表面積は約 $0.06 \text{ m}^2$ と概算されることから [ヒト脳皮質表面積は $0.16\text{-}0.2 \text{ m}^2$ であり (Essen and Druy, 1997)、ヒトの頭蓋内表面積は脳皮質表面積の約1/3である (Higetag and Barbas et al., 2009)。クモ膜の表面積が頭蓋内表面積と同じと仮定した場合、ヒト脳クモ膜の表面積は約 $0.06 \text{ m}^2$ と概算できる]、少なくとも脳クモ膜の表面積は脈絡叢の約3倍大きいことが示唆され、BABはCSF、特にクモ膜下腔のCSF中の薬物動態に大きく寄与する可能性が考えられる。しかし、約30年前Spectorらは「The arachnoid membrane is generally impermeable to water-soluble substances, and its role in forming a blood-CSF barrier is largely passive」、つまり「クモ膜は水溶性の物質を透過させず、関門としての役割は能動的なものではない」と提唱し (Spector and Johanson, 1989)、定説として広く信じられてきた。一方、近年Yasudaらによって、ヒトやマウスのクモ膜(軟髄膜)において、有機アニオン輸送担体であるOAT1/oat1, OAT3/oat3, mrp4, oatp1a4, モノカルボン酸輸送担体であるMCT1/mct1, 葉酸輸送担体であるRFC1など種々の輸送担体が遺伝子レベルで発現することが報告されている (Yasuda et al., 2013)。OAT/oat1,3やmrp4は水溶性の有機アニオンを輸送することが知られており、従来の「水溶性の物質を透過させず、能動的な役割を有さない」というクモ膜に対する定説を改める必要があると考える。また、MDR1/Mdr1a及びBcrpはタンパク質レベルで検出され、MDR1はヒト及びマウスBABの血液側膜に発現し、bcrpはマウスBABにおいて脳脊髄液側及び血液側膜両方に発現していることが報告されている (Yasuda et al., 2013)。脈絡叢に発現するMDR1, BCRPは脳脊髄液にとって異物解毒の役割を果たしていないことを考えると、クモ膜

に発現するこれら2つの輸送担体はその役割を担う可能性がある。臨床においてヒトではCSFは腰椎穿刺によって採取され (Lin et al., 2008; Ostermann et al., 2004)、げっ歯類では一般的にCSFは大槽から採取され (Liu et al., 2006)、これらの部位は脳実質組織や脈絡叢上皮細胞から遠く離れておりクモ膜上皮細胞に極めて近いことを考えると、CSF中の薬物動態の真実に迫るには、脈絡叢上皮細胞だけでなくクモ膜上皮細胞の物質輸送機能を解明する必要がある。

#### 血液脊髄関門について

血液脊髄関門 (blood-spinal cord barrier; BSCB)は脊髄毛細血管内皮細胞を実体とし、中枢の恒常性の維持において重要な役割を果たす中枢関門の一つである (Figure 1-1)。近年、BSCBにmdr1が発現し、脊髄からの薬物の排出に寄与することが報告されている (Koszdin et al., 2000; Maeda et al., 2013)。脊髄の実質組織と脳脊髄液間に障壁はなく、脳脊髄液は脊髄から枝分かれした神経束内に存在する隙間を通過してリンパ管に排出される経路も存在するため (Johnston et al., 2004)、BSCBに発現するmdr1は脊髄だけでなく脳脊髄液からの異物解毒の排出に寄与するかもしれない。

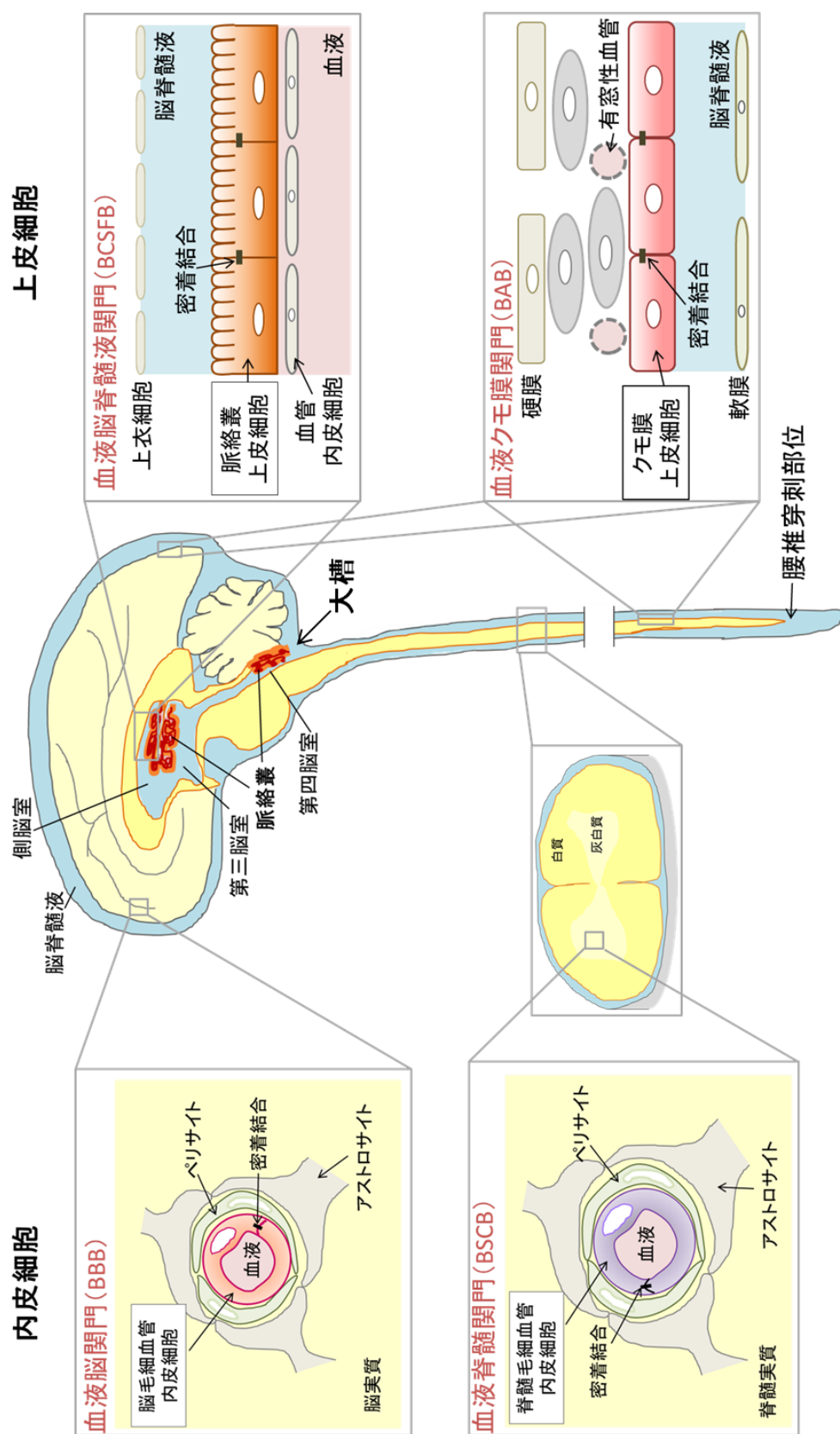


Figure 1-1 血液脳関門、血液脳脊髄液関門、血液クモ膜関門、血液脊髄関門の解剖学的特徴

## 第2節 血液網膜関門輸送研究の現状と課題

網膜は光の物理的エネルギーを電気信号に変換して脳に伝達する神経組織である。神経細胞によって作られる神経回路網は、イオンや神経伝達物質の細胞膜を挟んだ移動による信号を介して神経伝達を行っているため、網膜内の恒常性は厳密に維持する必要がある。

緑内障や糖尿病網膜症をはじめとする網膜疾患は失明へと結びつくため、それら疾患の治療は極めて重要な課題である。しかし、網膜への薬物送達はまだ難しく、典型的な目への薬物投与方法である点眼は涙液での希釈やその他の角膜や結膜における関門機構によってほとんど網膜へは到達しないことが知られている (Hosoya et al., 2005)。臨床では硝子体内投与が選択されるが、侵襲性が高く、硝子体内出血や網膜剥離などの重篤な副作用のリスクが高いことが問題となっている。そこで、血液を介した新規薬物送達経路の開拓が重要と考える。

網膜からの異物の排出や網膜へのニコチン酸、グルコースなど栄養供給など、血液と網膜間の物質動態は、網膜毛細血管内皮細胞を実体とする内側血液網膜関門 (inner Blood-retina barrier; Inner BRB)と網膜色素上皮細胞を実体とする外側血液網膜関門 (outer Blood-retina barrier; outer BRB)によって制御されており、特にinner BRBは網膜中栄養供給2/3を担っているため、主要な機能を有していると考えられる (Hosoya et al., 2005)。従って、BRBを介した物質輸送機構の解明は、循環血液から網膜への薬物移行性を理解し、網膜への薬物送達を達成する上で重要である。

これまで、ヒトやげっ歯類のBRBにおける輸送担体のmRNAおよびタンパク質発現についていくつかの解析が行われてきた (Asashima et al., 2006; Dahlin et al., 2013; Gnana-Prakasam et al., 2011) (Figure 1-2)。また、*in vivo*においても輸送担体の基質や阻害剤を用いたretinal uptake index, integration plot analysis, microdialysisや

gene-knockout miceの研究からBRBにおける輸送機能の解析が行われた (Hosoya et al., 2010; Hosoya et al., 2004; Katayama et al., 2006; Chapy et al., 2015; Chapy et al., 2016)。一方、未だ機能が完全に明らかにされていない輸送担体や未知の輸送担体を含み、複数の輸送担体において基質や阻害剤を共有する可能性があるため、それらの解析ではBRBにおける個々の輸送担体の寄与を明らかにすることは難しく、効率の良い薬物送達を目指すうえで重要な、どの輸送担体が網膜の物質動態への寄与がどれくらい大きいかは未だ明らかにされていない。

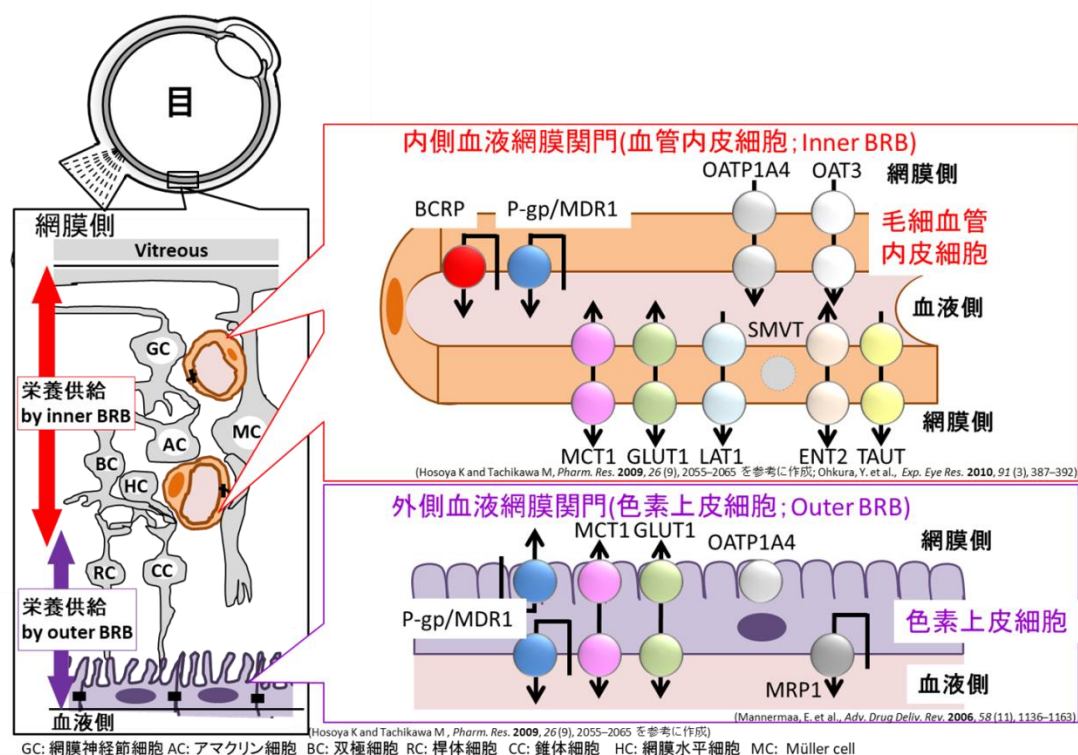


Figure 1-2 血液網膜関門における輸送担体の発現

### 第3節 LC-MS/MSに基づく標的絶対定量プロテオミクスによるタンパク質量法の有用性

第1節、第2節で述べた課題を解決するために、BCSFB、BAB、BRBにおける個々の輸送担体タンパク質に対し抗体の親和性などに依存しない、絶対量に基づいた評価が必要である。

mRNAは定量が可能であることから多種類のmRNAの発現量を特異的に解析できるが、細胞膜輸送担体のmRNA発現量は必ずしもその細胞膜上のタンパク質発現量に相関しない (Carl et al., 2010; Ohtsuki et al., 2011)。本研究室ではこれまでに複数の薬物代謝酵素CYPの酵素活性はmRNAよりもタンパク質発現量に相関することを示した (Ohtsuki et al., 2011)。また、P-gp、organic cation/carnitine transporter 1 (OCTN1/SLC22A4)及び MRP1のタンパク質発現量はそれぞれの輸送活性に相関することも報告されている(Tachibana et al., 2010; Sakamoto et al., 2016)。従って、各関門の個々の輸送担体のタンパク質発現量を明らかにすることは、各関門における個々の輸送担体輸送機能を推定するうえで有用であると考ええる。

これまで輸送機能を担う輸送担体タンパク質は細胞膜貫通型であり水に難溶性であることから分析が困難であった。これに対して本研究室は、タンパク質の酵素処理で産生されるペプチド断片の中から、アミノ酸配列に基づいて細胞膜外の水溶性領域から質量分析装置で高感度に定量可能なペプチドを選択する方法を開発した(Quantitative Targeted Absolute Proteomics, QTAP) (Kamiie et al., 2008)(Fig. 1-3)。In silicoクライテリアに基づいて選択したペプチドについて、安定同位体標識ペプチドを内部標準として、検量線を作成後、トリプシン消化サンプルを調製し、LC-MS/MSを用いてタンパク質の一斉定量を行う。これによって複数分子の絶対発現量を一斉に算出することができる。この手法は、免疫染

色並みの高感度を有しており、抗体よりも特異性が高く、タンパク質の絶対発現量を決定できるという長所があり、タンパク質が無くてもアミノ酸配列情報のみで定量法が確立できることからあらゆる動物種に適用できる。

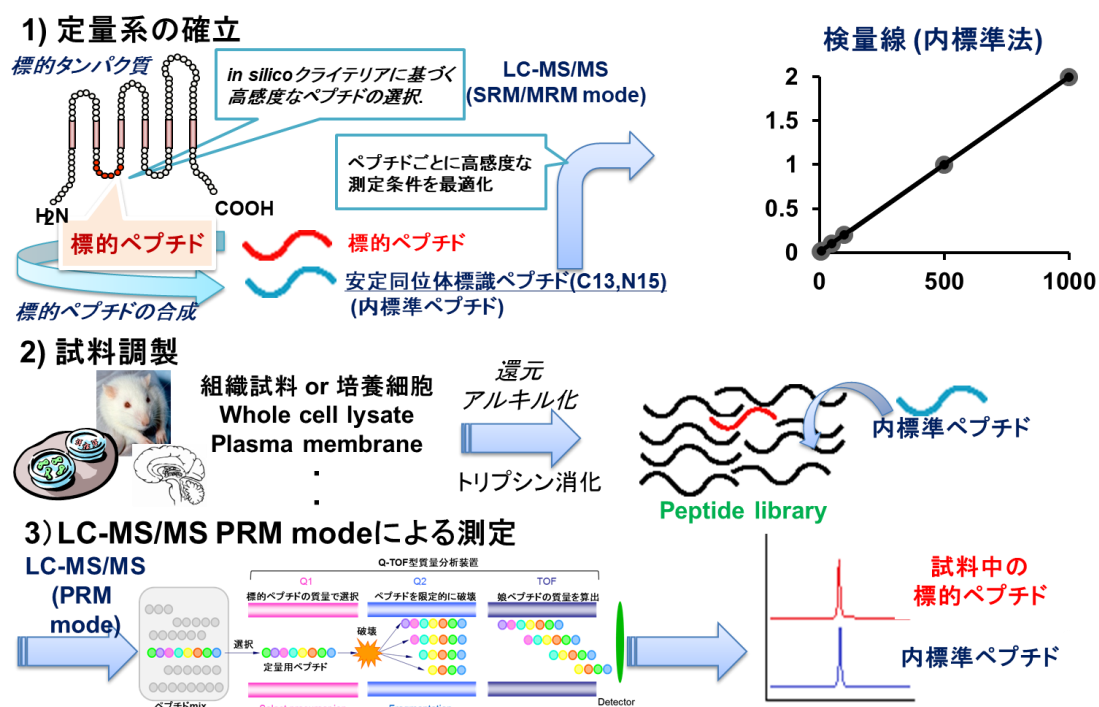


Figure 1-3 LC-MS/MSに基づく標的絶対定量プロテオミクスの実験プロトコル



#### 第4節 本研究の目的

前節まで、脳脊髄液中薬物動態における血液脳脊髄液関門、血液クモ膜関門の重要性や課題、血液網膜関門の分子基盤に関する研究の現状と課題について述べてきた。

本研究では、前述した研究背景や重要性、および研究課題に基づき、第2章ではQTAP法を用いてラット及びヒトBCSFBにおける輸送担体タンパク質発現量を解明し比較解析することで、BCSFBの輸送機能の種差を定量的に理解することを目的とした。第3章ではQTAP法に基づきラットBABにおける輸送担体タンパク質発現量を解明し、*in vivo*動態解析によってクモ膜上皮細胞に発現する薬物輸送担体が脈絡叢とは独立してクモ膜下腔の脳脊髄液中薬物の消失に寄与することを証明することを目的とした。また、第4章ではQTAP法に基づきinner BRBにおける輸送担体のタンパク質発現量を測定し、outer BRB・BBB・BCSFBと比較することで網膜への薬物送達に重要な輸送担体を解明することを目的とした。

## 第 2 章 標的定量絶対プロテオミクスに基づくラット及びヒト血液脳脊髄液専門輸送担体のタンパク質発現量の解明

### 第 1 節 序論

脈絡叢上皮細胞は BCSFB を形成し、種々の輸送担体を発現し血液と CSF 間の物質の移行を制御しているとされてきた。げっ歯類を中心に行われてきた様々な研究は BCSFB の輸送機構の研究を大きく進展させた。一方、個々の輸送担体の BCSFB 輸送機構に対する寄与の程度について不明な点もある。また、ヒトにおける BCSFB の役割を解明するには機能解析研究には限界がある。ヒトの BCSFB の輸送機能を明らかにする方法の一つとして、実験動物における BCSFB の輸送機能をヒトへ外挿する戦略が考えられるが、実験動物とヒト間の BCSFB の輸送機能の種差を考慮する必要がある。本研究室ではこれまで、マウスとサルにおける P-gp の基質の unbound brain-to-plasma concentration gradient ( $K_{p,uu,brain}$ )の種差は、それぞれの脳毛細血管における P-gp のタンパク質発現量の種差によってほとんど説明できることを示した (Uchida et al., 2014)。そこで、本研究室で樹立した QTAP 法を用いることで、個々の輸送担体の発現量から BCSFB における個々の輸送担体の輸送担体の寄与を推察するだけでなく、ヒトとの種差を評価するために有益な情報となると考えられる。

血漿中非結合型薬物濃度/脊髄液中非結合型薬物濃度( $K_{p,uu,CSF}$ )は脊髄液中への物質の分布量を表すパラメーターである。Pept2 は主に CSF 中からの oligopeptides (2-3 amino acids)及び  $\beta$ -lactam 抗菌薬などの peptidomimetics (ペプチド模倣薬)の排出に影響するとされている (Teuscher et al., 2001; Hu et al., 2007; Ocheltree et al., 2003)。いくつかの  $\beta$ -lactam 抗菌薬について、ヒトでの  $K_{p,uu,CSF}$  はラットよりも大きく、中でも moxalactam はラットの 20.5 倍であった (Friden et al.,

2009)。これは、ラットとヒトの **BCSFB** において、多様な輸送担体の機能の違いが存在することを示唆している。

本章では **QTAP** 法に基づきラット **BCSFB** における輸送担体タンパク質発現量プロファイルを明らかにし、またヒト単離脈絡叢 1 例と比較することによって、ラットとヒト **BCSFB** における輸送機能の種差を定量的に理解することを目的とした。

## 第2節 ラット脈絡叢細胞膜画分における輸送担体発現量解析

本研究では QTAP 法を用いて、19 種類の ABC トランスポーター、32 種類の SLC トランスポーターを含めた 53 種類のタンパク質発現量の測定解析を行った。その結果、17 種類のタンパク質が検出され、その他のタンパク質発現量は定量限界以下であった (Table 2-1、2-2)。

有機アニオン系輸送担体のひとつである Oatp1a5 はラットの脈絡叢において最も高い発現量を示し (30.3 fmol/μg protein)、同じ有機アニオン系輸送担体の oat3、mrp4、pept2 のタンパク質発現量のそれぞれ 8.99、21.8、9.90 倍であった。一方、脂溶性薬物輸送担体のうち、mrp1 が最も高い発現量を示し、mdr1a、bcrp のそれぞれ 17.1、16.4 倍であった。

脈絡叢上皮細胞マーカー分子である ae2 及び Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase はそれぞれ 34.9、121 fmol/μg protein の発現量を示した。

### 第3節 ラット及びヒト脈絡叢細胞膜画分における輸送担体発現量比較

ラットとヒト BCSFB に発現する輸送担体発現量の種差を明らかにするため、ヒト脈絡叢細胞膜画分における輸送担体タンパク質発現量と比較解析を行った (Table 2-1)。

有機アニオン系輸送担体うち、ヒト OATP1A2, PEPT2 の発現量はラットの oatp1a5, pept2 に比べそれぞれ 67.0, 8.27 倍低かった。また、ヒト及びラット脈絡叢における OAT3, MRP4 のタンパク質発現量の違いは 2 倍以内であった。一方、OATP3A1 及び ABCA8 はヒト脈絡叢のみで検出され、特に ABCA8 のタンパク質発現量はラットの abca8a の少なくとも 7.79 倍高い結果を示した。

有機カチオン輸送担体である MATE1 はヒト脈絡叢のみで検出され、そのタンパク質発現量はラットの少なくとも 5.98 倍以上であった。

脂溶性薬物排出輸送担体のうち、ヒト脈絡叢における MRP1 の発現量はラットより 4.02 倍低いのに対し、MDR1, BCRP の発現量はラットのそれぞれ 6.56、2.12 倍高かった。

甲状腺ホルモン輸送担体である OATP1C1 はヒト脈絡叢においては定量限界以下であり、ラットに比べ少なくとも 42.7 倍低かった。一方で、MCT8 はヒト脈絡叢においては検出されており、そのタンパク質発現量は 1.65 fmol/μg protein であった。

脈絡叢上皮細胞マーカー分子である AE2 の発現量のヒトとラット間の種差は約 1.45 倍であり、細胞膜マーカーである Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase については有意差を示さなかった。

**Table 2-1 Protein expression levels of transporters and marker proteins in the plasma membrane fractions of rat and human isolated choroid plexus.**

Molecular name (Rat / Human)	Protein expression level (fmol/ $\mu$ g protein)		Fold difference
	Rat	Human	Human/Rat
<b>Organic anion transporters</b>			
Oatp1a5/OATP1A2	30.3 $\pm$ 3.9	ULQ (< 0.452)	< 0.0149
Oat3/OAT3	3.37 $\pm$ 0.26	1.87 $\pm$ 0.12***	0.555
Mrp4/MRP4	1.39 $\pm$ 0.12	0.818 $\pm$ 0.142**	0.588
Oatp3a1/OATP3A1	ULQ (< 0.983)	0.641 $\pm$ 0.119	> 0.652
Abca8a/ABCA8	ULQ (< 0.195)	1.52 $\pm$ 0.27	> 7.79
<b>Peptide transporter</b>			
Pept2/PEPT2	3.06 $\pm$ 0.46	ULQ (< 0.370)	< 0.121
<b>Organic cation transporter</b>			
Mate1/MATE1	ULQ (< 1.44)	8.61 $\pm$ 0.63	> 5.98
<b>Lipophilic drug transporters</b>			
Mrp1/MRP1	5.47 $\pm$ 0.55	1.36 $\pm$ 0.11***	0.249
Mdr1a/MDR1	0.320 $\pm$ 0.034 <sup>#</sup>	2.10 $\pm$ 0.17***	6.56
Bcrp/BCRP	0.333 $\pm$ 0.115 <sup>#</sup>	0.706 $\pm$ 0.053**	2.12
<b>Thyroid hormone transporters</b>			
Oatp1c1/OATP1C1	6.66 $\pm$ 0.98	ULQ (< 0.156)	< 0.0234
Mct8/MCT8	Not measured	1.65 $\pm$ 0.16	-
<b>Hexose transporters</b>			
Glut1/GLUT1	9.88 $\pm$ 0.76	46.7 $\pm$ 1.1***	4.73
Glut5/GLUT5	Not measured	1.24 $\pm$ 0.19	-
Glut3,14/GLUT3,14	Not measured	0.472 $\pm$ 0.035	-
<b>Monocarboxylate transporters</b>			
Mct1/MCT1	3.60 $\pm$ 1.01	3.47 $\pm$ 0.26	0.964
Mct3/MCT3	2.75 $\pm$ 1.06	ULQ (< 0.921)	< 0.335
Mct4/MCT4	Not measured	0.382 $\pm$ 0.078	-
Mct5/MCT5	Not measured	0.685 $\pm$ 0.124	-
<b>Amino acid transporters</b>			
Lat2/LAT2	1.61 $\pm$ 0.18	ULQ (< 2.08)	< 1.29
4f2hc/4F2hc	0.806 $\pm$ 0.138	1.42 $\pm$ 0.28*	1.76
Eaat1/EAAT1	Not measured	5.04 $\pm$ 0.18	-
Cat1/CAT1	Not measured	1.22 $\pm$ 0.15	-
<b>Folate transporters</b>			
Rfc/RFC	2.37 $\pm$ 0.46	3.68 $\pm$ 0.09***	1.55
Pcft/PCFT	Not measured	1.78 $\pm$ 0.17	-
<b>Creatine transporter</b>			
Crt1/CRT1	1.25 $\pm$ 0.26 <sup>#</sup>	0.450 $\pm$ 0.138***	0.360

<b>Nucleoside transporter</b>			
Ent1/ENT1	Not measured	$2.49 \pm 0.12$	-
<b>Monoamine transporter</b>			
Pmat/PMAT	ULQ (< 2.93)	$0.288 \pm 0.041$	> 0.0983
<b>Epithelial cell markers</b>			
Ae2/AE2	$34.9 \pm 1.8$	$24.1 \pm 0.5^{**}$	0.691
Claudin-11/claudin-11	Not measured	$4.40 \pm 0.97$	-
Claudin-3/claudin-3	Not measured	$2.03 \pm 0.18$	-
JAM-A/JAM-A	Not measured	$2.34 \pm 0.35$	-
<b>Plasma membrane marker</b>			
$\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}/\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$	$121 \pm 12$	$117 \pm 2$	0.967
<b>Endothelial cell marker</b>			
VE-cadherin/VE-cadherin	Not measured	$0.526 \pm 0.144$	-

Plasma membrane fractions of rat choroid plexuses were prepared from the pooled fresh choroid plexus tissues of 30 Wistar rats (non-frozen). The plasma membrane fractions were digested with Lys-C and trypsin, and injected into the nanoLC-TripleTOF5600 together with internal standard peptides. The target and the corresponding internal standard peptides were measured in the MRM-HS mode of TripleTOF5600. In data analysis using a MultiQuant software, the peak data of the peptides were extracted by four sets of SRM/MRM transitions per peptide optimized prior to the experiment, the protein expression levels were determined by taking the peak area ratios of target and internal standard peptides in each set of transition, and then averaged by using the values obtained from at least three SRM/MRM transitions. Furthermore, the protein expression levels were calculated as an average of data obtained in one to three experiments. The protein expression levels were shown as the mean  $\pm$  SD in this table.

This mean and SD represent the average and variability of four to twelve values obtained from three or four SRM/MRM transitions in one to three experiments, respectively. #, the protein expression level of bcrp, mdr1a and crt1 in rat were calculated as average (mean) and variability (SD) of six quantitative values obtained from two SRM/MRM transitions in three experiments ( $6 = 2 \times 3$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , significantly different from the protein expression levels in rat choroid plexus. No significant difference was observed between rat and human for mct1/MCT1 and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ( $p > 0.05$ ). “ULQ” represents under the limit of quantification. The values (fmol/ $\mu\text{g}$  protein) of the limit of quantification were shown in parentheses. “Not measured” means the molecules which were not measured in the present study. The protein expression levels in human choroid plexus were divided by those in rat, and shown as “Fold difference Human/Rat”. Nomenclature was given in lower-case letters for the rat homologs and capital letters for the human homologs. Human OATP1A2 was considered to be a possible homolog of rat oatp1a5 according to the similarity in the amino acid sequences.



**Table 2-2 Molecules under the limit of quantification.**

Molecule	LQ (fmol/μg protein)	Molecule	LQ (fmol/μg protein)	Molecule	LQ (fmol/μg protein)
<b>Rat</b>					
ABC transporters					
Abc1	0.573	Abca7	0.395	Mrp5	1.27
Abc2	4.50	Abca8a	0.195	Mrp6	1.50
Abc3	1.52	Abca12	3.31	Mrp7	0.586
Abc4	0.451	Abc13	4.22	White	1.47
Abca5	0.421	Bsep	0.795	Abcg5	0.0206
SLC transporters					
Eaat2	3.05	Pgt	1.81	Ata1	2.95
Asct1	0.663	Oct1	1.08	Ata2	1.79
Net	3.26	Oct2	0.699	Ata3	3.65
Taut	4.50	Oct3	0.138	Oatp1a1	0.0624
Bgt1	0.209	Oat1	1.13	Oatp3a1	0.983
Lat1	1.24	Oat2	0.932	Mate1	1.44
Ntcp	1.02	Urat1	3.86	Oatp6b1	0.0476
Asbt	1.03	Pmat	2.93		

Molecules for which the protein expression levels were under the limit of quantification were shown. The values of limit of quantification (LQ) in the plasma membrane fractions of the isolated choroid plexus were calculated with the unit of fmol/μg protein as described in ‘Materials and methods’, so that the values of LQ can be compared with the protein expression levels of the detected molecules described in Table 2-1.

#### 第4節 考察

本研究では、初めてラット及びヒト BCSFB における輸送担体タンパク質発現量プロファイルを明らかにした。また、ラット及びヒト間で比較することによって、ラットでは発現量がヒトと類似している輸送担体もある一方、種間で顕著な違いを示す輸送担体もあり、げっ歯類で測定された機能をそのままヒトに適応できる場合とそうでない場合があることが示唆された。

#### OATP1A2/oatp1a5 について

脳内で産生される種々の内因性神経ステロイドはニューロン興奮をはじめとする生理学的現象において重要な役割を果たしており、CNS の恒常性を維持するため、これらの分子は CNS から排除される必要がある。Estrone-3-Sulfate ( $E_1S$ ) や Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) といった有機アニオン性代謝物は水溶性であり、脂質二重層で構成される細胞膜を通過することは容易ではないが、BCSFB を含む中枢関門を介した排出システムの存在が報告されている (Asaba et al. 2000, Kitazawa et al. 2000)。また、Prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ) は虚血や細菌感染時に神経炎症を引き起こし、その CSF 中濃度は脳卒中の重症度と相関して上昇するが、正常時では BCSFB を介した排出系によって低濃度に維持されている (Tachikawa et al., 2012)。 $E_1S$  や DHEAS、 $PGE_2$  は organic anion transporter 3 (oat3)、organic anion transporter polypeptide 1a5 (oatp1a5)、prostaglandin transporter (pgt)、organic anion transporter polypeptide 3a1 (oatp3a1) を含むいくつかの BCSFB に発現する輸送担体の基質であるが (Kanai et al. 1995; Cattori et al. 2001; Kusuhara and Sugiyama 2004; Tachikawa et al. 2012)、これらの輸送担体の上記化合物に対する寄与度合は不明であった。Oat3 は  $PGE_2$  の排出に寄与しているが、単離脈絡叢及び rat oat3-expressing oocytes を用いた  $PGE_2$  の uptake 実験から得られた  $K_m$  値は異

なっており(それぞれ 23  $\mu$ M、4.24  $\mu$ M)、oat3 が PGE<sub>2</sub> の主要な排出輸送担体であるか否かは不明であった。本研究において、ラット oatp1a5 のタンパク質発現量は oat3 の 8.99 倍高い結果を示した (Table 2-1)。一方、pgt のタンパク質発現量は定量限界以下であり (Table 2-2)、pgt を介した PGE<sub>2</sub> uptake の K<sub>m</sub> 値は 94 nM (Kanai et al., 1995) と単離脈絡叢と大きく異なる。これらの結果から、oatp1a5 の単分子輸送活性は他の輸送担体より低い可能性は否めないが、*in vivo* BCSFB において oatp1a5 は oat3 や pgt よりも PGE<sub>2</sub> (E<sub>1</sub>S や DHEAS も同様に) の CSF からの排出に大きく寄与していることが示唆された。また oatp1a5 は、内因性物質だけでなく、fexofenadine, pravastatin, pitavastatin, tebipenem, talinolol や endothelin receptor antagonist など多様な両親媒性の有機アニオン性薬物の輸送も担うことから (Tamai, 2012)、ラット BCSFB において oatp1a5 を介した有機アニオン性物質の強力な排出輸送経路が存在することが推察できる。

OATP1A2 は oatp1a5 のヒト homolog であり、ヒト脈絡叢における発現量は定量限界以下 (<0.452 fmol/ $\mu$ g protein) と oatp1a5 の少なくとも 67.0 倍低い (Table 2-1)。ヒト BCSFB における OATP1A2 を介したこれら内因性物質の排出輸送はきわめて制限されていると考えられる。一方、ヒト BCSFB においてのみ検出された Multidrug and toxin extrusion protein 1 (MATE1), ATP-binding cassette sub-family A member 8 (ABCA8), Organic anion transporter polypeptide 3A1 (OATP3A1) は E<sub>1</sub>S を輸送することが報告されており (Nakanishi & Tamai 2014, Tanihara et al., 2007, Tsuruoka et al., 2002)、ヒトにおいて上記 3 種類の輸送担体が OATP1A2 の代替として、E<sub>1</sub>S の CSF からの排出に寄与する可能性が考えられる。一方、OATP3A1 は DHEAS を輸送するが (Nakanishi & Tamai 2014, Radford et al., 2010)、その発現量はラットの oatp1a5 と比較して 40 倍以上低いことから (Table 2-1)、OATP3A1 だけでは DHEAS の CSF からの排出を全て賄えない可能性が高い。β-blocker で

ある propranolol 及び metoprolol のヒトとラットにおける  $K_{p,uu,CSF}$  は同程度であるが (human/rat ratio; 0.857 for propranolol, and 2.16 for metoprolol)、atenolol についてヒトはラットより 15 倍大きい (Friden et al., 2009)。Kato らは、atenolol は OATP1A2 に輸送されるが、propranolol 及び metoprolol は輸送されないことを報告している (Kato et al., 2008)。Oatp1a5 については、これらの化合物が基質であるか否かについて不明であるが、OATP1A2 と類似した基質認識性を有している可能性が考えられる。従って、atenolol における顕著な種差は、ラット BCSFB の oatp1a5 によって積極的に排出されたことが一因であると考えられる。

#### PEPT2/pept2 について

Pept2 は、脈絡叢上皮細胞の CSF 側膜に発現し、glycylsarcosine (Glysar), carnosine, cefadroxil や 5-Aminolevulinic acid (5-ALA) などの small oligopeptides (2-3 amino acids)や L-kyotorphin などの dipeptide の CSF からの排出を担っている (Shen et al., 2004; Ocheltree et al., 2004; Teuscher et al., 2001; Chen et al., 2017; Jiang et al., 2009)。

ヒト脈絡叢における PEPT2 の発現量は定量限界以下であり (<0.370 fmol/ $\mu$ g protein)、ラットに比べて少なくとも 8.27 倍低い (Table 2-1)。5-ALA は精神神経疾患であるポルフィリン症に関係し、通常その CSF への分布は pept2 によって制限されている。ポルフィリン症患者において血中の 5-ALA 濃度は 1.8-13  $\mu$ M まで上昇する (Lindberg et al., 1999)一方、5-ALA を慢性投与したマウスにおいて 5-ALA の血中濃度 (約 23  $\mu$ M)はポルフィリン症患者と同程度を示すにも関わらず、神経障害はほとんど見られない (Hu et al., 2007)。この神経毒性に対する種差は BCSFB における PEPT2 の低発現によってヒト CSF からの 5-ALA の排出活性が低く、中枢へ 5-ALA の蓄積がげっ歯類より多い可能性が考えられる。ヒト-

ラット間の PEPT2/pept2 発現量の種差から、ヒトにおける PEPT2 の基質の CSF への移行性についてもラットよりも高いことが予想され、ラットからヒトへの外挿にはこの違いを考慮する必要がある。

一方、pept2 のラット脳における発現量は、懐胎 17 日目から生後 10 週齢の間において、加齢とともに顕著に低下することが報告されている (Shen et al., 2004)。10 週齢以降では不明であるが、高齢者では若年者より発現量が減少している可能性は否めない。本解析では、92 歳の高齢者の検体を用いたことから加齢による発現低下を反映している可能性がある。今後、広い年齢層の検体を用いた解析が必要と考える。

#### OAT3/oat3、MRP4/mrp4 について

げっ歯類を用いた解析から、oat3 は BBB および BCSFB に発現し、パラアミノ馬尿酸(PAH)、フルオレセイン、Prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>)をはじめとする親水性な有機アニオン性化合物の CNS からの排出を担っていることが示され、CNS において特に重要な働きをする輸送担体として位置づけされてきた(Sweet et al., 2002; Mori et al., 2003; Tachikawa et al., 2012b)。しかし、最近のヒトやカニクイザルの BBB の QTAP 解析において、OAT3 は検出されず、霊長類の CNS では重要な働きはしていない疑問があった(Uchida et al., 2011; Hoshi et al., 2013)。本研究からヒト BCSFB において OAT3 タンパク質発現が検出されたことからヒト CNS からの有機アニオンの排出輸送に寄与していることが示唆された。脈絡叢上皮細胞の blood 側膜に発現する MRP4/Mrp4 は、種々の内因性物質や topotecan などの薬物の脊髄液からの排出に寄与し、また、しばしば OAT3 と基質が共通していることから、OAT3 と協調的に CSF からの有機アニオン性物質の排出に寄与していると考えられる。本研究の解析から、ヒト脈絡叢における OAT3 及び MRP4

のタンパク質発現量はラット脈絡叢よりそれぞれ 1.80、1.70 倍低いことが示された (Table2-1)。Benzylpenicillin、cefotaxime および baclofen は、OAT3 と MRP4 の基質であり (Yee et al., 2013; Ci et al, 2007; Uchida et al., 2007; Ohtsuki et al., 2002)、ヒトにおけるこれら薬物の  $K_{p,uu,CSF}$  はラット比べてそれぞれ 1.5~3.0、6.3、24 倍大きいことが報告されている (Rolinson and Sutherland 1965; Rousselle et al., 2002; Friden et al., 2009; Kodaira et al., 2011)。ヒト脈絡叢において OAT3 と MRP4 がラットと比べより低発現することに起因する低い排出輸送活性が、ヒト CSF 中において上記薬物のより多い分布の原因の一部であることが考えられる。

#### OATP1C1/oatp1c1、MCT8/mct8 について

甲状腺ホルモンは細胞の成長や代謝だけでなく中枢の発達においても重要であり、甲状腺から分泌され血液を介して中枢へ供給される。げっ歯類を用いた解析から、*oatp1c1* と *mct8* は BCSFB における甲状腺ホルモンの輸送に重要な役割を果たしていることが示されている (Friesema et al., 2003; Pizzagalli et al., 2002)。げっ歯類とヒトの脈絡叢においてこれら 2 種類のタンパク質が発現していることが示されている (Roberts et al., 2008)。げっ歯類では、*mct8* が CSF 側に、*oatp1c1* は両側に発現し、BCSFB を介した甲状腺ホルモンの輸送が成り立っている (Roberts et al., 2008)。本研究から、ヒト脈絡叢において MCT8 タンパク質が検出されたが、OATP1C1 は定量限界以下であり、ラットに比べて 42 倍以上小さいことが示された (Table 2-1)。興味深いことに、ヒトではげっ歯類と異なり、MCT8 は CSF 側と血管側の両側に発現する (Roberts et al., 2008)。ヒト BCSFB において、OATP1C1 の低発現による血管側側の輸送の欠乏を補うために、MCT8 が両側に発現し、経細胞輸送を成立させていることが考えられる。

## PMAT 及び MATE1 について

PMAT は脈絡叢上皮細胞の CSF 側膜に発現する有機カチオン輸送担体であり (Duan et al., 2013)、serotonin (5-HT), dopamine などの生体アミン、1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)などの神経毒素、metformin, atenolol などのカチオン系薬物を排出し (Duan et al., 2013, Wang et al., 2016)、生理的にも異物解毒機構としても重要な役割を果たしていると考えられる。

MATE1 は腎臓において生体異物や内因性物質など有機カチオン系物質の排出輸送を担うとされているが、中枢関門においてその mRNA 発現量の低さから、中枢の物質動態への寄与は小さいと考えられてきた (Duan et al., 2013, Shawahna et al., 2007)。しかし、本研究では QTAP 法を用いることではじめてヒト脈絡叢において MATE1 タンパク質を定量することができた (Table 2-1)。MATE 1 の細胞膜局在性は不明であるが、内因性物質である creatinine や N-methylnicotinamide (NMN)、神経毒物である MPP や tetraethylammonium (TEA)を輸送することから (Tanihara et al., 2007; Terada et al., 2006)、解毒機構としての役割を担っていると考えられる。血漿中に比べ creatine は脳内において、約 100 倍高濃度で存在しエネルギー蓄積の役割を担っている。Creatine のリン酸エネルギー貯蔵型である creatine phosphate は化学的に不安定で、その代謝物の creatinine は脳内で大量に産生され、痙攣などの神経障害を引き起こすため、中枢から効率良く排出されることが必須である (Tachikawa et al., 2008)。Creatinine は BBB からの排出は著しく制限されており、BCSFB 経由の排出経路が主であると考えられる (Tachikawa et al., 2008)。また、NMN の過度の生成はパーキンソン病の病因に関係する可能性があり、正常時では中枢において低濃度に保つ必要がある (Williams et al., 2005)。これらのことから、ヒト BCSFB において MATE1 は、CSF からカチオン性の神経毒性物質を排出し、中枢を保護する重要な役割の一端を

担う可能性があり、局在性を含めた MATE1 のヒト BCSFB における輸送特性解析は今後の重要な課題である。

#### 脈絡叢上皮細胞純度について

脈絡叢は、BCSFB を形成する上皮細胞以外に血管や軟膜などを含む (Strazielle et al., 2000)。そこで、ヒト-ラット種間の脈絡叢中の上皮細胞の純度の違いを評価するために、脈絡叢の上皮細胞マーカータンパク質である AE2/ae2 のタンパク質発現量解析を行った。結果、ヒトとラット間における AE2/ae2 のタンパク質発現量の違いは、1.5 倍以内であった。また、細胞膜マーカーである  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase の発現量は有意差がなかったことから、本研究に用いたヒト及びラット脈絡叢に含まれる上皮細胞の純度、調製された細胞膜の純度は同程度であることが示唆され、本研究で得られたヒト及びラット脈絡叢におけるタンパク質発現量の違いはヒト - ラット BCSFB の種差をある程度反映していると考えられる。

#### 脈絡叢に含まれる血管が輸送担体タンパク質発現量に与える影響について

VE-cadherin は脈絡叢に含まれる内皮細胞に特異的に発現することが報告されている (Williams et al., 2005)。本研究において VE-cadherin が検出されたことから、目的の輸送担体が内皮細胞に発現する場合、その発現量が本研究で得られた定量結果に影響を及ぼす可能性がある。そこで、報告されているヒト脳毛細血管における VE-cadherin のタンパク質発現量 (1.61 fmol/ $\mu\text{g}$  protein of whole cell lysate of brain microvessels、Shawahna et al., 2011)を用い、以下の過程から脈絡叢血管内皮細胞が定量結果に与える影響を推察できると考える。1) 脳血管内皮細胞において、細胞膜画分における膜タンパク質は whole cell lysate より約 5 倍豊



富に存在するとされている(Ohtsuki et al., 2013)。従って、ヒト脳毛細血管細胞膜画分における VE-cadherin のタンパク質発現量は  $5 \times 1.61 = 8.05$  fmol/ $\mu$ g protein of plasma membrane fraction of brain microvessels と概算できる。2) 免疫染色により、脈絡叢における VE-cadherin の発現密度は脳実質血管より高いことが報告されている (Williams et al., 2005)。従って、脈絡叢血管細胞膜画分における VE-cadherin のタンパク質発現量は 8.05 fmol/ $\mu$ g protein of plasma membrane fraction of choroid plexus capillaries より高いことが示唆される。3) 本研究で得られた VE-cadherin のタンパク質発現量 (0.526 fmol/ $\mu$ g protein of plasma membrane fraction of whole choroid plexus)と比較した結果、少なくとも 15 倍低い。この結果から、本研究で用いた脈絡叢に含まれる血管の割合は 1/15 以下であることが示唆された。従って、血管の定量結果に与える影響はさほど大きくないと考えられる。

#### 本研究における限界

本研究における限界の一つとして、ヒト 1 例のみを用い、その donor は鬱及び痴呆を患う 92 歳患者である。鬱や痴呆が BCSFB の輸送担体の発現や機能に影響を及ぼす報告はないが、鬱病患者において CSF 中の transthyretin (脈絡叢で産生され CSF 中に排出される)濃度が減少することが報告されている (Sullivan et al., 1999)。従って、鬱によって脈絡叢に影響を及ぼす可能性が考えられる。3-36 月齢のラット脈絡叢において P-gp 及び low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) の mRNA 発現量は減少し、LRP2 は上昇することが報告されており (Liu et al., 2014)、本研究で解析した 92 歳 donor における輸送担体のタンパク質発現量はより若い成人と異なる可能性を示唆している。更に、脈絡叢による CSF の産生速度には個人差があることが報告されていることから (Gideon et al., 1994)、脈絡叢の機能についても個人差がある可能性がある。従って、より幅

広い年齢層の健常人の脈絡叢を用いた更なる解析が必要である。

#### 輸送活性を推定するうえで考慮すべき要因

ヒトとラットではアミノ酸配列が異なることから、輸送担体に対する基質の親和性や1分子の輸送速度が異なる可能性があり、タンパク質発現量の単純比較による種差の理解には限界がある。しかし、各輸送担体タンパク質の遺伝子発現細胞系を用いて1分子輸送活性を各動物について測定することでこれが補正可能である。輸送担体の輸送活性に影響する要因として、タンパク質発現量だけでなく、固有活性、基質親和性、細胞膜局在、ドライビングフォース、基質の非結合型分率、受動拡散速度などが挙げられ、これらの要因についても考慮すべきではあるが、本研究では、輸送活性に影響する少なくとも一つの要因であるタンパク質発現量の種差を明らかにした。定量結果の一部は既報の輸送活性の種差と相関したことから、タンパク質発現量に基づいて、ヒトと実験動物間の輸送機能の差を推定可能であることが示唆された。

本章では、ラット及びヒトBCSFBにおける輸送担体のタンパク質発現量プロフィール及び種差を初めて明らかにした。PEPT2/pept2、OATP1A2/oatp1a5、MRP1/mrp1、OATP1C1/oatp1c1など、BCSFBの機能として重要な役割を担う多くの輸送担体のタンパク質発現量が、ラットとヒトで有意に異なることが示された。本研究で明らかにした発現量プロフィールに基づいて、モデル系の限界を理解した上で適切な実験に用いることで、げっ歯類を用いた解析結果を最大限に利用することが可能であると考えられる。

### 第 3 章 標的絶対定量プロテオミクスに基づくラット血液クモ膜関門輸送担体タンパク質発現量の解明及び有機アニオン系輸送担体に着目した機能解析

#### 第 1 節 序論

従来 CSF 中の薬物動態は脈絡叢上皮細胞を実体とする BCSFB によって主に制御されているとされてきた。一方、80%の CSF がクモ膜下腔に存在していることから(Thorne et al., 2014)、脳室内に存在する BCSFB が全ての CSF 中の薬物動態を制御していると断定することはできない。また、脈絡叢上皮細胞の細胞膜輸送機能だけで脳脊髄液中の物質動態を説明できない現象が動物実験レベルで報告されている(Guldborg et al., 1966; Morikawa et al., 1998; Kodaira et al., 2011)。BCSFB では Mdr1a と bcrp は CSF 側細胞膜に発現している (Rao et al., 1999; Tachikawa et al., 2005)。mdr1a 及び bcrp knockout mice を用いた研究では、wild type と比較して脳実質への移行が上昇したのに対し、脳室の CSF への移行が減少したことが報告されている (Shen et al., 2010)。これらの報告は、mdr1a 及び bcrp は BCSFB において血液から CSF へ基質を輸送することを示唆している。一方、mdr1 及び bcrp の基質のそれぞれ mdr1a/1b (-/-) knockout mice、bcrp (-/-) knockout mice における CSF-plasma concentration ratio ( $K_{p,CSF}$ )は wild-type mice と比較して上昇することが報告されており (Kodaira et al., 2011)、CSF 中の薬物動態は未だコントロールが難しい状態である。Kodaira らは、knockout mice では、BBB の mdr1 や bcrp が欠損したために、脳内の基質濃度が上昇し、脳室へ流れ込み CSF 中濃度が上昇したと考えていたが (Kodaira et al., 2011)、我々は 2 つの報告における CSF の採取部位に着目した。Shen らの報告において、CSF は microdialysis 法を用いて直接脳室から採取している (Shen et al., 2010)のに対し、Kodaira らの報告において、CSFはクモ膜下腔である大槽において採取されている (Kodaira et

al., 2011)。この採取部位の違いが結果の相反性の起因であり、クモ膜下腔には脈絡叢以外の CSF からの排出経路の存在を示唆していると考えた。

クモ膜上皮細胞は血液クモ膜関門 (BAB)を形成し、クモ膜下腔の CSF に直接接するもう一つの関門である (Nabeshima et al., 1975)。その表面積は少なくとも脈絡叢の約 3 倍と推定されることから (Dohrmann et al., 1970; Essen and Druy, 1997; Higetag and Barbas et al., 2009)、CSF 中の薬物動態に大きく寄与する可能性が考えられる。しかし、従来の定説では「クモ膜は水溶性物質を透過せず、脳脊髄液関門としての役割は能動的なものではない (Spector and Johanson, 1989)」とされ、CSF 中薬物動態におけるクモ膜上皮細胞の役割についてほとんど研究されてこなかった。近年、Yamada らによってヒトやマウスのクモ膜においていくつかの輸送担体の発現が報告され、BAB が能動的な関門として機能する可能性が示された。

以上のような背景から、本研究では「脈絡叢上皮細胞と同様にクモ膜上皮細胞も独自の機能を有し、この 2 つの関門が CSF 中薬物濃度を決定する」と仮説を提唱した。この仮説を証明するために、1) ほとんどの輸送担体が遺伝子レベルでのみしか発現が分かっていない現状において、BAB 特異的に発現する輸送担体を機能の実体であるタンパク質レベルで定量的に明らかにすること。2) CSF からの薬物の消失へのその輸送担体の寄与を、阻害剤を用いた *in vivo* 解析で明らかにすること という 2 つの戦略を掲げ取り組むこととした。

そこで、本章では QTAP 法に基づき、クモ膜上皮細胞に発現する薬物輸送担体が脈絡叢とは独立してクモ膜下腔の CSF 中薬物の消失に寄与することを証明することを目的とした。

## 第2節 ラット軟髄膜細胞膜画分における輸送担体タンパク質発現量解析

QTAP を用いて、ラット軟髄膜細胞膜画分における 19 種類の ABC トランスポーター、32 種類の SLC トランスポーターを含む 61 種類のタンパク質の発現量を測定解析した。結果、33 種類のタンパク質が検出され、その他は定量限界以下であった (Table 3-1, 3-2)。

ABC トランスポーターのうち Mdr1a は最も高発現を示し(16.6 fmol/μg protein)、次いで bcrp であった (3.27 fmol/μg protein)。SLC トランスポーターのうち、oat1, oat3, organic anion transporting polypeptide 1a4 (oatp1a4/slc21a5), organic anion transporting polypeptide 1a5 (oatp1a5/slc21a7), organic anion transporting polypeptide 3a1 (oatp3a1/slc21a11), 及び organic anion transporting polypeptide 1c1 (oatp1c1/slc21a14)の6種類の有機アニオン輸送担体が検出されそのタンパク質発現量はそれぞれ 2.73, 6.65, 8.86, 0.298, 0.427 及び 0.195 fmol/μg protein であった。

アストロサイトマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP)、ペリサイトマーカーである neuron-glial antigen 2 (NG2)、ニューロンマーカーである synaptophysin (SYP)、及び脳毛細血管内皮細胞マーカーである γ-gtp が検出され脳実質のコンタミが示唆された。

### 第3節 ラット軟髄膜及び脈絡叢における輸送担体タンパク質発現量比較解析

ラット軟髄膜における輸送担体タンパク質発現量を第2章で示したラット脈絡叢と比較解析を行った (Table 3-1, Figure 3-1)。軟髄膜において、Mdr1a 及び bcrp のタンパク質発現量は脈絡叢のそれぞれ 51.9、9.82 倍であった。有機アニオン系輸送担体のうち、oat1 及び oatp3a1 は軟髄膜においてのみ検出され、脈絡叢においては定量限界以下であった。一方、oatp1a5 及び oatp1c1 の脈絡叢におけるタンパク質発現量は軟髄膜のそれぞれ 102、34.2 倍であった。Oat3 のタンパク質発現量の違いは2倍以内であった。

**Table 3-1 Protein expression levels of transporters and marker protein in rat brain  
leptomeninges and choroid plexus**

Molecule name	Protein expression level (fmol/ $\mu$ g protein) <sup>a</sup>		Fold difference
	Leptomeninges	Choroid plexus <sup>b</sup>	Leptomeninges/Choroid plexus
<b><i>Abc transporter</i></b>			
Abca1/Abc1	0.262 <sup>*</sup> $\pm$ 0.020	ULQ (< 0.573)	> 0.457
Abca2/Abc2	0.620 <sup>*</sup> $\pm$ 0.033	ULQ (< 4.50)	> 0.138
Abca8a	1.70 $\pm$ 0.17	ULQ (< 0.195)	> 8.72
Abca9	1.58 <sup>*</sup> $\pm$ 0.41	Not measured	-
Abcb1a/Mdr1a	16.6 $\pm$ 0.2	0.320 <sup>#</sup> $\pm$ 0.034	51.9
Abcc1/Mrp1	0.671 $\pm$ 0.107	5.47 $\pm$ 0.55	0.123
Abcc4/Mrp4	0.510 $\pm$ 0.045	1.39 $\pm$ 0.12	0.367
Abcc6/Mrp6	0.165 <sup>*</sup> $\pm$ 0.037	ULQ (< 1.50)	> 0.110
Abcc7/Mrp7	0.118 $\pm$ 0.013	ULQ (< 0.586)	> 0.201
Abcg2/Bcrp	3.27 $\pm$ 0.10	0.333 <sup>#</sup> $\pm$ 0.115	9.82
<b><i>Slc transporter</i></b>			
Slc1a2/Eaat2	18.8 $\pm$ 1.1	ULQ (< 3.05)	> 6.16
Slc2a1/Glut1	56.6 $\pm$ 0.4	9.88 $\pm$ 0.76	5.73
Slc3a2/4f2hc	2.45 $\pm$ 0.05	0.806 $\pm$ 0.138	3.04
Slc4a2/Ae2	0.726 $\pm$ 0.050	34.9 $\pm$ 1.8	0.0208
Slc6a8/Crt1	0.381 $\pm$ 0.018	1.25 <sup>#</sup> $\pm$ 0.26	0.305
Slc7a8/Lat2	ULQ (< 0.0684)	1.61 $\pm$ 0.18	< 0.0425
Slc15a2/Pept2	0.938 $\pm$ 0.063	3.06 $\pm$ 0.46	0.307
Slc16a1/Mct1	17.1 $\pm$ 0.1	3.60 $\pm$ 1.01	4.75
Slc16a8/Mct3	ULQ (< 0.153)	2.75 $\pm$ 1.06	< 0.0556
Slc19a1/Rfc1	1.33 $\pm$ 0.04	2.37 $\pm$ 0.46	0.561
Slc21a5/Oatp1a4	8.86 $\pm$ 0.12	Not measured	-
Slc21a7/Oatp1a5	0.298 $\pm$ 0.014	30.3 $\pm$ 3.9	0.00983
Slc21a11/Oatp3a1	0.427 $\pm$ 0.040	ULQ (< 0.983)	> 0.434
Slc21a14/Oatp1c1	0.195 $\pm$ 0.018	6.66 $\pm$ 0.98	0.0293
Slc22a6/Oat1	2.73 $\pm$ 0.07	ULQ (< 1.13)	> 2.42
Slc22a8/Oat3	6.65 $\pm$ 0.20	3.37 $\pm$ 0.26	1.97
slc38a2/Ata2	1.73 $\pm$ 0.16	ULQ (< 1.79)	> 0.966
<b>Others</b>			
CD147	12.2 $\pm$ 0.2	Not measured	-

<b>Membrane marker</b>			
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	191 ± 9	121 ± 12	1.58
<b>Tight junction marker</b>			
Claudin5	0.988 ± 0.024	Not measured	-
Occludin	0.127* ± 0.032	Not measured	-
<b>Astrocyte marker</b>			
GFAP	1.81 ± 0.37	Not measured	-
<b>Pericyte marker</b>			
NG2	0.904 ± 0.131	Not measured	-
<b>Neuron marker</b>			
SYP	0.604 ± 0.097	Not measured	-
<b>Endothelial cell marker</b>			
γ-gtp	0.177** ± 0.075	Not measured	-

<sup>a</sup>Plasma membrane fractions were prepared from rat leptomeninges. The plasma membrane fractions (50 µg protein/sample × 1 sample = 50 µg protein in total) were digested with Lys-C and trypsin, and injected into the nanoLC-TripleTOF5600 together with internal standard peptides. Three measurements of each tissue were made (3 injections/sample × 1 sample for leptomeninges). The target and the corresponding internal standard peptides were measured in the MRM-HS mode of TripleTOF5600. In data analysis using MultiQuant software, the peak data of the peptides were extracted using four sets of PRM transitions per peptide pair (target peptide and the corresponding internal standard peptide), optimized prior to the experiment. If positive peaks were observed in three or four sets of transitions as defined in the report by Uchida et al. (18), the protein expression levels were determined by taking the peak area ratios of target



and internal standard peptides in each set of transition, and then averaged by using the values obtained from at least three PRM transitions in one measurement. Furthermore, the protein expression levels were calculated as an average of data obtained in three measurements. The protein expression levels were shown as the mean  $\pm$  SD in this table.

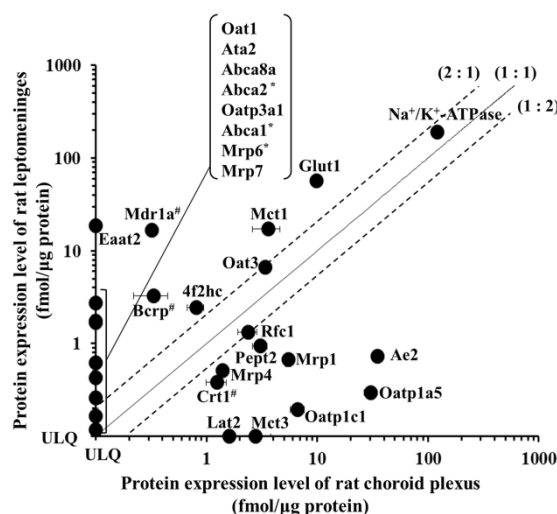
<sup>b</sup>, Data of choroid plexus was taken from Uchida et al., 2015.<sup>\*</sup>, the protein expression levels of abc1, abc2, abca9, mrp6, occluding in rat leptomeninges were exceptionally calculated as the average (mean) and variability (SD) of six quantitative values obtained from only two SRM/MRM transitions per measurement in the three measurements (6 = 2 x 3). <sup>\*\*</sup>, the protein expression level of  $\gamma$ -gtp was only exceptionally calculated as the average (mean) and variability (SD) of six quantitative values obtained from 1-3 SRM/MRM transitions per measurement in the three measurements. <sup>#</sup>, the protein expression levels of bcrp, mdr1a and crt1 in rat choroid plexus were exceptionally calculated as the average (mean) and variability (SD) of six quantitative values obtained from only two SRM/MRM transitions per measurement in the three measurements (6 = 2 x 3). Note that these expression levels are not necessarily quantitatively accurate, and they are given for reference purposes only. “ULQ” represents under the limit of quantification. The values (fmol/ $\mu$ g protein) of the limit of quantification are shown in parentheses. ‘Not measured’ indicates molecules that were not measured in the present

study. Protein expression levels in leptomeninges were divided by those in choroid plexus, and the resulting values are shown as ‘Fold difference Leptomeninges/Choroid plexus’.

**Table 3-2 Molecules under the limit of quantification**

Molecule	LQ (fmol/ $\mu$ g protein) <sup>a</sup>	Molecule	LQ (fmol/ $\mu$ g protein) <sup>a</sup>
Abc transporter			
Abca3/Abc3	0.218	Abcb11/Bsep	0.0657
Abca4/Abc4	0.129	Abcc5/Mrp5	0.102
Abca5	0.0386	Abcg1/White	0.173
Abca7	0.165	Abcg5	0.0525
Abca12	0.604		
Slc transporter			
Slc1a4/Asct1	0.0730	Slc22a3/Oct3	0.121
Slc6a2/Net	1.49	Slc22a7/Oat2	0.0540
Slc6a6/Taut	1.44	Slc22a12/Urat1	2.07
Slc7a5/Lat1	0.143	Slc29a4/Pmat	0.0749
Slc7a8/Lat2	0.0684	Slc38a1/Ata1	0.0918
Slc10a2/Asbt	0.537	Slc38a4/Ata3	0.107
Slc16a8/Mct3	0.153	Slc47a1/Mate1	0.928
Slc21a2/Pgt	0.121	Oatp1a1	0.0270
Slc22a2/Oct2	0.178	Oatp6b1	0.0563
Others			
Pld	0.278		

<sup>a</sup>Molecules for which the protein expression levels were under the limit of quantification are listed. If no positive peak was observed or a positive peak(s) was only detected in one or two PRM transitions, the protein expression level was defined as under the limit of quantification (ULQ). The third most sensitive transition (based on the peak intensity of the internal standard peptide) was used to calculate LQ of the target molecule. The values of limit of quantification (LQ) in each tissue were calculated with the unit of fmol/ $\mu$ g protein as described in the report by Uchida et al. (18), so that the values of LQ can be compared with the protein expression levels of the detected molecules described in Table 1.



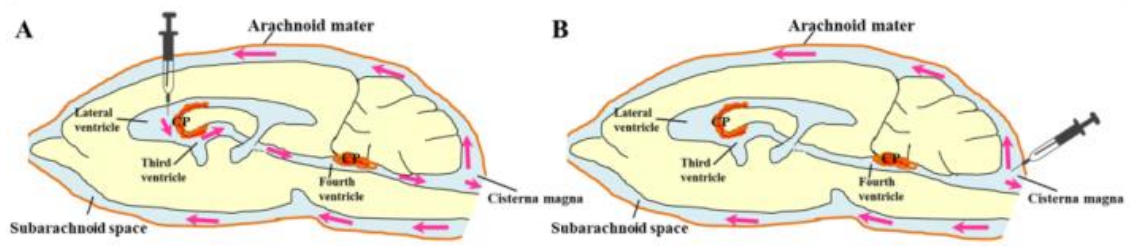
**Figure 3-1 Comparison of protein expression levels of transporter and marker proteins between rat brain leptomeninges and choroid plexus**

Data for rat leptomeninges are taken from Tables 1. Data for choroid plexus are taken from Uchida et al. (18). Each point represents mean  $\pm$  SD (fmol/ $\mu$ g protein). The solid line passing through the origin represents the line of identity, and the broken lines represent 2-fold differences. ULQ, under the limit of quantification. \*, the protein expression levels of abca1, abca2 and mrp6 in rat leptomeninges were exceptionally calculated as the average (mean) and variability (SD) of six quantitative values obtained from only two SRM/MRM transitions transitions per measurement in the three measurements ( $6 = 2 \times 3$ ). #, the protein expression levels of bcrp, mdr1a and crt1 in rat choroid plexus were exceptionally calculated as the average (mean) and variability (SD) of six quantitative values obtained from only two SRM/MRM transitions per

measurement in the three measurements ( $6 = 2 \times 3$ ). Note that these expression levels are not necessarily quantitatively accurate, since there were only two transitions per measurement, and they are given for reference purposes only.

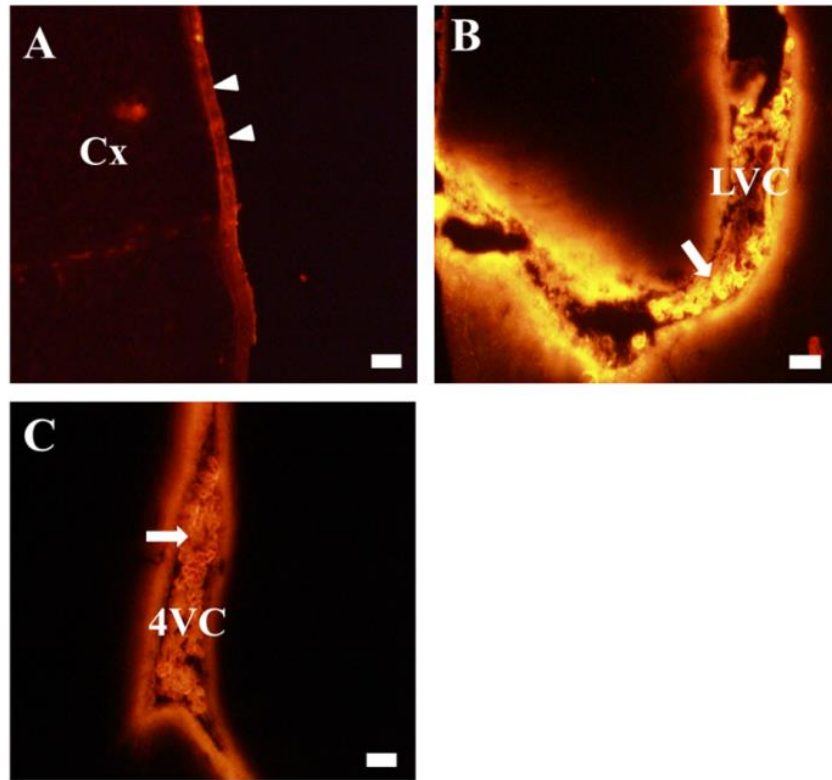
#### 第4節 脳室内投与、大槽内投与後 rhodamine 123 の脳室内及びクモ膜下腔 CSF 中の分布

機能解析に向けて、脈絡叢の影響を回避するため大槽内投与法を樹立した (Figure 3-2)。大槽内投与法の有用性を確かめるため、蛍光物質である rhodamine123 を用いてそれぞれ脳室内及び大槽内投与を行った。脳室内投与の結果、脳表面の軟髄膜に加え全ての脳室内の脈絡叢において蛍光が検出された (Figure 3-3)。一方、大槽内投与後、脳表面の軟髄膜においてのみ強い蛍光が検出され、すべての脳室内の脈絡叢においては蛍光が検出されなかった (Figure 3-4)。これらの結果から、大槽内投与法は脈絡叢の影響を回避可能であり、血液クモ膜関門の機能のみを評価できる有用な手法であることが示された。



**Figure 3-2 Schematic illustration of intraventricular administration (A) and intracisternal administration (B)**

Arrows, flow direction of injected substance. *CP*: choroid plexus.

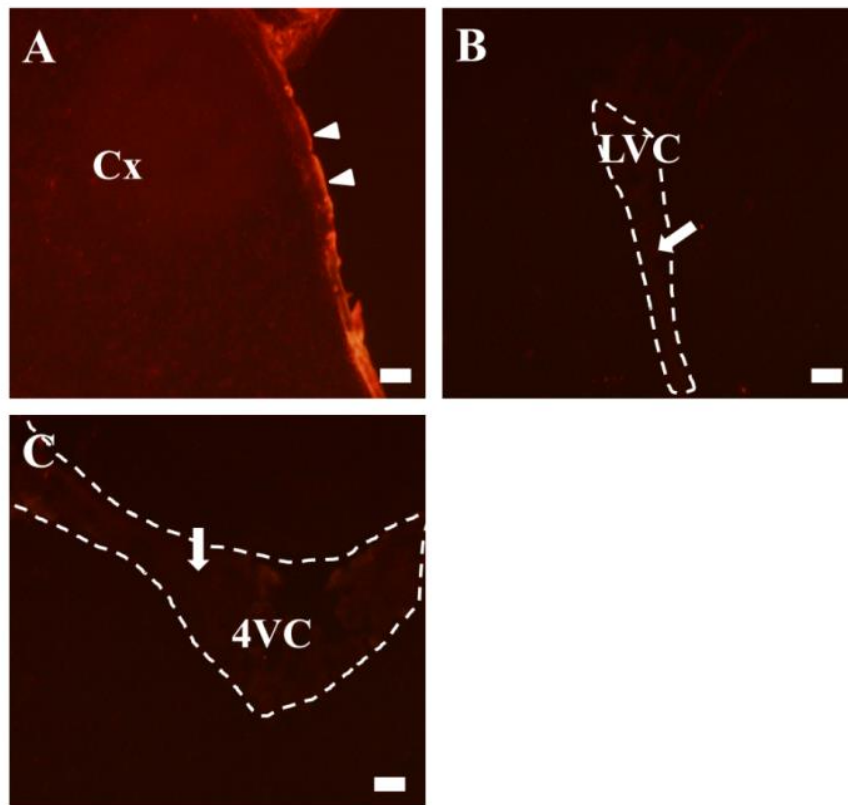


**Figure 3-3 Distribution of rhodamine 123 in brain after intraventricular administration in rats.**

Fluorescence due to rhodamine 123 was predominantly detected both in the leptomeninges (arrowheads) at the surface of the brain (A) and choroid plexus (arrows) in the lateral ventricle (B) and fourth ventricle (C). Scale bars: A, 100  $\mu\text{m}$ ; B-D, 200  $\mu\text{m}$ .

*Cx*; cortex, *LVC*; lateral ventricle, *4VC*; fourth ventricle.





**Figure 3-4 Distribution of rhodamine 123 in brain after intracisternal administration in rats.**

Fluorescence due to rhodamine 123 was predominantly detected in the leptomeaninges (arrowheads) at the surface of the brain (A). In contrast, there was no signal in the choroid plexus (arrows) in the lateral ventricle (B) and fourth ventricle (C). Scale bars:

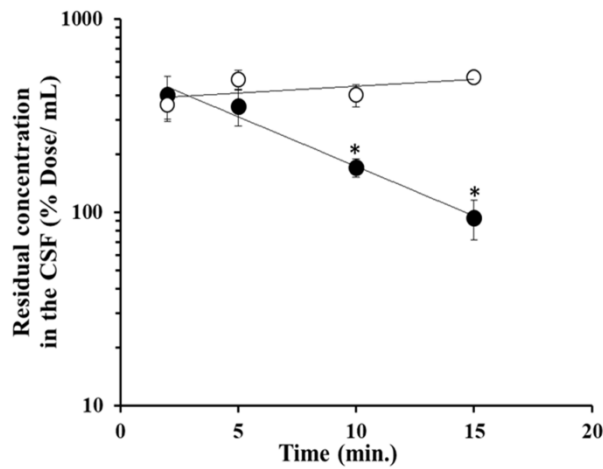
A, 100  $\mu\text{m}$ ; B-D, 200  $\mu\text{m}$ . *Cx*; cortex, *LVC*; lateral ventricle, *4VC*; fourth ventricle.

## 第5節 大槽内投与法を用いたパラアミノ馬尿酸 (PAH)のCSFからの排出

機能解析にあたり、血液クモ膜関門の機能を評価するため、軟髄膜のみで検出された輸送担体に着目した。中でも、細胞への吸着や拡散が少ない水溶性有機アニオン系輸送担体である *oat1*, *oatp3a1* に着目した。そのうち *oatp3a1* の 6.39 倍高い発現量を示した *oat1* を対象分子とし、その典型的な基質である PAH を用いて動態解析を行うこととした。Figure 3-5 は大槽内に投与した PAH 及び FITC-inulin の投与量で規格した CSF 中薬物濃度 ((% of dose)/mL CSF)の経時変化を示したグラフである。Bulk flow マーカーである FITC-inulin は少なくとも 15 min では CSF から消失しなかった。一方、大槽内に投与した PAH は CSF 中から時間依存的に消失し、2 min から 15 min の見かけ上の消失クリアランスは 26.5  $\mu\text{L}/\text{min}$  と算出された。これは報告されている CSF bulk flow (2.9  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 脳室内投与, Suzuki et al., 1985)の 9.14 倍速い消失である。

*Oat1* の寄与を明らかにするため、阻害実験を行った。PAH は軟髄膜において検出された *oat3* の基質としても知られている(Kusuhara et al., 1995)。*Oat1* 及び *oat3* は認識する基質を幅広く共有しているため、特異的な阻害剤の選択は困難である。そこで、基質の *oat1* と *oat3* それぞれに対する  $\text{IC}_{50}$  の値に着目した (Jung et al., 2002)。cephalosporin antibiotics の *oat1* 及び *oat3* に対する  $\text{IC}_{50}$  の報告 (Jung et al., 2002)から、*oat3* に対しより親和性が高い antibiotics のうち cephalothin の *oat1* (0.57 mM)及び *oat3* (0.08 mM)に対する  $\text{IC}_{50}$  値の違いが最も大きく、一方、*oat1* に対しより親和性が高い antibiotics のうち ceftriaxone の *oat1* (0.84 mM)及び *oat3* (>2 mM)に対する  $\text{IC}_{50}$  値の違いが最も大きいことから、これら 2 つの薬物を阻害剤とし、阻害実験を行った。Table 3-3 で示したように、3 mM cephalothin (*oat1* と *oat3* 両方を阻害)存在下では 15 min 時の CSF 中 PAH の(% of dose)/mL CSF は FITC-inulin と比較して有意差を示さず、その CSF 中からの排出が 100%阻害さ

れたことが示された。一方、0.2 mM cephalothin (oat3 のみを選択的に阻害)存在下では PAH の CSF の消失は 17%有意に阻害された (Table 3-3)。Ceftriaxone を用いた阻害実験においては、1.7 mM (oat1 のみを選択的に阻害)と 4.2 mM (oat1 と oat3 両方を阻害)の ceftriaxone 存在下では PAH の CSF からの消失は 100%阻害された (Table 3-3)。



**Figure 3-5 *In vivo* uptake of para-aminohippuric acid (PAH) from CSF after intracisternal administration.**

The CSF concentration versus time profiles of PAH (closed circle) and FITC-inulin (open circle) after intracisternal administration. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=6-10). The concentrations of PAH and FITC-inulin remaining in the cisterna CSF was determined at the designated times. FITC-inulin was used as a reference for CSF turnover and passive diffusion into the brain parenchyma. The values are expressed as the percentage of the dose remaining per milliliter of CSF. \*The values of %Dose/mL of PAH and FITC-inulin were significantly different at 10 min and at 15 min. ( $p<0.01$ )

**Table 3-3 Inhibitory effects of cephalothin and ceftriaxone on PAH uptake from the CSF after intercisternal injection in rats at 15 min.**

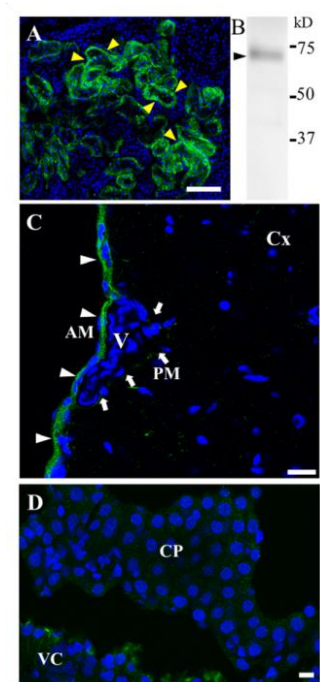
Inhibitor	Concentration of inhibitor (mM)	%Dose/mL <sup>a</sup>			
		PAH		FITC-inulin	
Cephalothin	0	51.1 ±	12.3	364 ±	33
	0.2	123 <sup>*</sup> ±	14	542 ±	46
	3	469 <sup>*</sup> ±	78	432 <sup>b</sup> ±	32
Ceftriaxone	0	43.9 ±	5.4	373 ±	55
	1.7	414 ±	29	452 <sup>b</sup> ±	32
	4.2	515 ±	47	448 <sup>b</sup> ±	45

<sup>a</sup>Pre-administration of different concentrations of cephalothin (0.2 or 3 mM) and ceftriaxone (1.7 or 4.2 mM) inhibited the uptake of PAH compared with the buffer-administered control. Each value represents mean ± S.E.M. (n=5-6). <sup>b</sup>No significant difference between the %Dose/mL of PAH and FITC-inulin with 3 mM cephalothin, 1.7 and 4.2 mM ceftriaxone, respectively. <sup>\*</sup>The values of %Dose/mL of PAH with or without inhibitor were significantly different. ( $p < 0.01$ )

## 第 6 節 免疫染色及び Western blotting 法を用いた oat1 の発現及び局在解析

Oat1 のクモ膜における発現及び局在を明らかにするため、免疫染色を行った。抗体の有用性を確かめるため、ラット腎臓切片を用いて免疫染色、ラット軟髄膜細胞膜画分を用いて western blotting を行った。Figure 3-6 で示したように、免疫染色の結果、oat1 は腎臓の近位尿細管上皮細胞の basolateral membrane に発現することが示された(Figure 3-6A)。また、western blotting の結果、70-75 kDa に oat1 の特異的なバンドが検出され(Figure 3-6B)、抗体の特異性が示された。以上の結果により、oat1 抗体の有用性が示された。

この抗体を用いて、ラット脳切片の免疫染色を行った。解剖学的にクモ膜及び軟膜はクモ膜下腔の血管の両側にそれぞれ存在し、クモ膜は硬膜側、軟膜は脳実質側に位置する (Nolte et al., 2008)。Figure 3-6C で示したように、oat1 は CSF に面しているクモ膜に発現し、軟膜においては発現が見られなかった。また、脈絡叢において oat1 の発現は検出されず (Figure 3-6D)、これは本研究における QTAP 及び過去に報告されている western blotting 解析の結果 (Nagata et al., 2002) と一致している。



**Figure 3-6 Protein expression of oat1 at rat kidney cortex (A), plasma membrane of rat leptomeninges (B), rat brain surface (C) and choroid plexus (D).**

(A) Oat1 immunofluorescence (green) in the kidney. Intense immunostaining was detected on the basolateral membrane of the proximal tubule epithelial cells (yellow arrowheads). (B) Western blotting showed that anti-oat1 antibody labeled a specific band of 70-75 kDa. (C) Intense immunolabeling of oat1 (green) was detected at the arachnoid membrane (white arrowheads), but no oat1 was detected at the pia mater (arrows). (D) No oat1 was detected at the choroid plexus. Nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (blue). Scale bars: A, 200  $\mu\text{m}$ ; C, 25  $\mu\text{m}$ ; D, 200  $\mu\text{m}$ .

*AM*: arachnoid mater, *PM*: pia mater, *V*: vessel, *CP*: choroid plexus, *VC*: ventricle, *Cx*: cortex

## 第7節 考察

本研究は初めて軟髄膜における輸送担体のタンパク質発現量を明らかにし、血液クモ膜関門に発現する oat1 および oat3 が脈絡叢とは独立して CSF からの水溶性有機アニオン系薬物である PAH の消失に寄与することを証明した。

### Oat1 及び oat3 について

本研究から、ラット軟髄膜において oat1, oat3, oatp1a4 などの有機アニオン系輸送担体を含む種々の輸送担体が発現することを明らかにした。また、本研究から、1) PAH は 26.5  $\mu\text{L}/\text{min}$  の速さで CSF 中から消失したのに対し、bulk flow マーカーである FITC-inulin は 15 min まで CSF からの消失は認められなかった。2) oat3 のみを選択的に阻害できると考えられる 0.2 mM cephalothin 存在下において PAH の CSF からの消失は約 17% 阻害され、oat1 及び oat3 両方を十分に阻害できると考えられる 3 mM cephalothin 存在下において PAH の CSF からの消失は完全に阻害された。これは oat1 と oat3 が主に CSF からの PAH の消失に加担しており、その寄与率はそれぞれ 83%、17%であることが示唆された。また、免疫染色により、oat1 は軟膜ではなく CSF に面しているクモ膜に発現していること、脈絡叢において oat1 のタンパク質発現量は定量限界以下であったこと (Uchida et al., 2015)、免疫染色 (Figure 3-6D) 及び western blotting (Nagata et al., 2002) から脈絡叢において oat1 のタンパク質の発現が検出されなかったことから、oat1 を介した PAH の CSF からの消失は BCSFB とは独立した血液クモ膜関門独自の機能であることが示唆された。以上の結果から、「血液クモ膜関門は CSF 中薬物動態において能動的な関門ではない」という過去概念を再考するときがきたと言える。

Oat1 及び oat3 は indoxyl sulfate などの尿毒症毒素を輸送する (Nigam et al., 2015)。



これらの毒素は尿毒症患者において腎不全により効率よく排出されることができず、血漿中濃度が上昇することが知られている (Niwa et al., 2010)。また、腎不全は尿毒症脳症など CNS 機能不全を伴う複数の生理学的変化を引き起こすことも報告されている (Schoots et al., 1989)。更に、*oat1* 及び *oat3* の基質である HVA の CSF 中の濃度の増加は譫妄の臨床的特徴と関連している (Ramirez-Bermudez et al., 2008)。脳実質表面に位置する軟膜は密着結合を形成していないため、脳実質とクモ膜下腔の CSF 間における物質交換は生じうる。またクモ膜下腔から脳実質へ flow があることが近年報告されており (Iliff et al., 2012)、BAB に発現する *oat1* 及び *oat3* は上記内因性の毒性物質の脳実質への流入を防ぎ、脳実質を保護するために機能している可能性が考えられる。一方、*oat1* が BCSFB ではなく BAB のみに発現する原因は現段階では不明である。BAB におけるこのような輸送担体の生理学的役割について更なる研究が必要である。

#### Mdr1a 及び bcrp について

*Mdr1a* 及び *bcrp* は BBB において様々な外因性の物質や薬物の血液への排出を担う重要な排出輸送担体として知られている。一方、これらの輸送担体は脈絡叢上皮細胞において、subapical 及び apical 側 (CSF 側) に発現している (Rao et al., 1999; Tachikawa et al., 2005)。加えて、*mdr1a* 及び *bcrp* はそれらの基質である topotecan 血中から脳室内に輸送することが報告されており (Shen et al., 2010)、この報告において CSF は microdialysis 法を用いて直接脳室から採取している (Shen et al., 2010)。これらの報告は、*mdr1a* 及び *bcrp* は BCSFB において流入輸送担体 (血液から CSF へ) として機能することを示唆している。一方、いくつかの種の動物やヒト脈絡叢において MDR1/*mdr1a* 及び BCRP/*bcrp* が低い発現量を示しているのにも関わらず (Uchida et al., 2015; Matsumoto et al., 2015; Gazzin et

al., 2008; Baechr et al., 2006; Braun et al., 2017)、これらの基質について血中及び CSF 中の濃度を比較し、CSF からの確実な排出が認められている (Braun et al., 2017)。また、mdr1 の基質である quinidine と verapamil の mdr1a/1b (-/-) knockout mice における  $K_{p,CSF}$  及び bcrp の基質である daidzein と genistein の bcrp (-/-) knockout mice における  $K_{p,CSF}$  は wild-type mice と比較して上昇することが報告されている (Kodaira et al., 2011)。これらの報告において、CSF はクモ膜下腔である大槽において採取されている (Braun et al., 2017; Kodaira et al., 2011)。本研究において、ラット軟髄膜における mdr1a 及び bcrp のタンパク質発現量は脈絡叢のそれぞれ 51.9、9.82 倍高い結果であった。また、免疫染色の結果、mdr1a はクモ膜上皮細胞において apical 側 (硬膜側)、bcrp は両側に発現していることが報告されており (Yasuda et al., 2013)、これらの結果から、BAB に発現する mdr1a 及び bcrp は排出輸送担体 (CSF から血中へ) として機能することが示唆された。これが mdr1 と bcrp 基質の knockout mice における  $K_{p,CSF}$  が wild-type mice より上昇した原因であると考えられる。興味深いことに、Kaddoumi らの報告では、Shen ら (Shen et al., 2010)とも Kodaira ら (Kodaira et al., 2011)とも異なり、P-gp 阻害剤により基質の脳実質への移行は増大するが、CSF への移行は増大しないことを示している (Kaddoumi et al., 2007)。種差の可能性も否めないが (Kaddoumi らはサルを、Shen らと Kodaira らはマウスを用いている)、CSF の採取場所も考慮すべきと考える。Kaddoumi らの報告において、CSF は腰椎穿刺によって採取されている。腰のクモ膜下腔の CSF も脊髄クモ膜に覆われているため (Vandenabeele et al., 1996)、脊髄の BAB は脳 BAB と異なる機能を有している可能性が考えられる。今後脊髄 BAB における輸送担体の発現や機能を明らかにするため更なる研究が必要である。

### 脳室内投与法及び大槽内投与法について

従来、CSF からの物質の消失を解析するために脳室内投与法が一般的に用いられてきた。しかし、それでは脳室内に存在する脈絡叢の影響を避けることができず、脈絡叢において *oat3* のタンパク質発現量が得られたことから、クモ膜関門の機能のみを評価するためには新しい手法の樹立が必要であった。そこで、本研究では、CSF は脳室内の脈絡叢で産生され、大槽という空間を経て、脳及び脊髄のクモ膜下腔を一方方向で流れている性質と大槽という部位から CSF を採取する方法があることに着目し、逆に大槽に投与することで脈絡叢の影響を回避できるのではないかと考え、大槽内投与法を樹立した(Figure 3-2)。Figure 3-3 で示したように、脳室内投与の結果、脳表面の軟髄膜に加え全ての脳室内の脈絡叢において蛍光が検出された。一方、大槽内投与後、脳表面の軟髄膜においてのみ強い蛍光が検出され、すべての脳室内の脈絡叢においては蛍光が検出されなかった (Figure 3-4)。これらの結果から、大槽内投与法は脈絡叢の影響を回避可能であり、BAB の機能のみを評価できる有用な手法であることが示された。

### CSF 中非結合型薬物濃度 ( $C_{u,CSF}$ )について

CSF は脳実質に直接接しているため、従来、CSF 中非結合型薬物濃度 ( $C_{u,CSF}$ ) は脳実質内非結合型薬物濃度( $C_{u,brain}$ )と一致すると考えられ、 $C_{u,brain}$  のサロゲートとして用いられていた (Nagaya et al., 2014; Lin et al., 2008; Liu et al., 2006; Ostermann et al., 2004)。しかし、 $C_{u,CSF}$  と  $C_{u,brain}$  一致しない例も報告されており (Kodaira et al., 2011; Lin et al., 2008)、 $C_{u,CSF}$  と  $C_{u,brain}$  はそれぞれ BCSFB 及び BBB によって制御されてい説が提唱されている (Takasawa et al., 1997)。BBB 及び BCSFB における輸送担体の発現プロファイルが異なっていることから (Redzic et al., 2011)、この説がより合理的であると考えられる。一方、CSF 中薬物濃度を

測定する際、実験動物において一般的に大槽から (Liu et al., 2006)、ヒトにおいて一般的に腰椎穿刺 (Lin et al., 2008; Ostermann et al., 2004)によってそれぞれ CSF を採取している。大槽及び腰クモ膜下腔は解剖学的に脳室から遠く離れていることから、脈絡叢上皮細胞 (BCSFB)はそれらクモ膜下腔の  $C_{u,CSF}$  をも制御しているとは断定できない。BAB は直接クモ膜下腔の CSF に接していることを考えると、クモ膜下腔の CSF 中の薬物濃度は BCSFB よりも BAB によって調節されている可能性が高い。BAB における輸送機能は  $C_{u,brain}$  と  $C_{u,CSF}$  の違いにも加担している一因であると考えられる。

#### クモ膜上皮細胞以外の組織のコンタミについて

ラット脳軟髄膜細胞膜画分において GFAP、NG2 及び SYP が検出されたことから (Table 3-1)、脳実質及び BBB のコンタミを否定できない。GFAP は細胞質により局在しており、また、NG2 は軟髄膜内にも存在する平滑筋細胞に発現しているため (Hughes et al., 2004)、これら 2 種類のタンパク質をコンタミ評価のマーカ分子として用いることは不適切であると考えた。そこで、本研究ではニューロンマーカ分子であり、細胞膜に発現する SYP に着目した。ラット全脳組織細胞膜画分における SYP のタンパク質発現量は  $3.20 \text{ fmol}/\mu\text{g protein}$  であった。これは軟髄膜における SYP の発現量の 5.30 倍高く、脳実質のコンタミ率は 20%以下であることを示唆する。更に、脳毛細血管内皮細胞マーカである  $\gamma\text{-gtp}$  の軟髄膜細胞膜画分におけるタンパク質発現量は  $0.177 \text{ fmol}/\mu\text{g protein}$  であった。本研究室の以前の報告では、ラット BBB の whole cell lysate における  $\gamma\text{-gtp}$  のタンパク質発現量は  $2.55 \text{ fmol}/\mu\text{g protein}$  であった (Hoshi et al., 2013)。脳毛細血管内皮細胞において、細胞膜画分における膜タンパク質は whole cell lysate より約 5 倍豊富に存在するとされていることから (Ohtsuki et al., 2013)、 $\gamma\text{-gtp}$  の BBB の

細胞膜画分におけるタンパク質発現量は約 12.8 fmol/ $\mu$ g protein と推察でき、軟髄膜より 72.3 倍高い発現量である。このことから、BBB のコンタミ率は 1.4%ほどに過ぎず、BAB の定量結果に対し及ぼす影響はほとんどないと言える。

一方、現段階では物理的に軟膜とクモ膜を分離することは難しく、QTAP に用いたサンプルは軟膜及びクモ膜を含む軟髄膜組織である。各膜における特異的なマーカーはまだ報告されていないが、構造学的に軟膜はクモ膜よりも遥かに薄いことが報告されていることから (Saboori et al., 2015)、本研究で用いた軟髄膜組織はクモ膜をより多く含んでいることが考えられる。今後、各膜におけるマーカーの同定及びクモ膜のみの単離方法の樹立が必要である。

#### CSF に接しているもう一つの関門、血液脊髄関門 (BSCB)について

BAB や BCSFB に加え、脊髄毛細血管内皮細胞から構成される BCSB においても MDR1 及び BCRP が発現している (Maeda et al., 2013)。脊髄実質と CSF 間には関門が存在していないため、クモ膜下腔の CSF 中における薬物は脊髄実質へ拡散する可能性がある。従って、BSCB も CSF 中の薬物動態に寄与する可能性を否めない。しかし、本研究において 2 min では 100%の PAH が CSF に残留していたことから、2 min 時では PAH は脊髄実質へ拡散していないことが示唆された。BSCB と CSF 間には軟膜が存在するのに対し、BAB は直接 CSF 接していることを考えると、クモ膜下腔の CSF において BAB が主に CSF 中の PAH の動態を制御していると考えられる。

本章では、ラット BAB における輸送担体のタンパク質発現量プロファイルを初めて明らかにした。機能解析では、BAB の機能のみを評価可能な大槽内投与法を新規に樹立した。大槽内投与法を用いて、BAB に発現する oat1 と oat3 は脈

絡叢と独立してクモ膜下腔 CSF 中からの PAH の消失を担っていることが示唆された。これらの結果から、BAB は水溶性の物質を透過させることができ、クリアランスシステムとして機能し、CSF 中の薬物動態を制御していることが示唆された。

## 第 4 章 ブタ内側血液網膜関門における輸送担体タンパク質発現量解析及び外側血液網膜関門、血液脳関門、血液脳脊髄液関門との比較解析

### 第 1 節 序論

第 1 章で述べたように、網膜疾患は失明へと結びつくためその治療は極めて重要な課題である。網膜には inner BRB と outer BRB が存在し、特に inner BRB は網膜中栄養供給の 2/3 を担っており、血液と網膜間の物質移行において主要な役割を果たしていると考えられる (Hosoya et al., 2005)。BRB を介した物質輸送機構の解明は、循環血液から網膜への薬物移行性を理解し、新たな網膜への薬物送達を達成する上で重要である。これまで BRB においていくつかの輸送担体の発現が報告されているが (Asashima et al., 2006; Dahlin et al., 2013; Gnana-Prakasam et al., 2011)、各輸送担体の寄与度合は明らかにされていない。そこで、本研究室が樹立した QTAP 法を用いることで、複数の輸送担体のタンパク質発現量を一齐に定量することが可能である (Kamiie et al., 2008)。Mdr1a はマウス BBB において 14.1 fmol/ $\mu$ g protein の高発現量を示しており (Uchida et al., 2011)、mdr1 の基質の mdr1a (-/-) knockout mice における脳内濃度は wild type に比べて顕著に増加することから (Kusuhara et al., 2001)、mdr1a はマウス BBB において排出輸送を担っていることが示唆された。一方、マウス BBB における mrp1 タンパク質発現量は定量限界以下であり (Agarwal et al., 2012)、Mdr1a/1b double-knockout mice 及び Mrp1/mdr1a/1b triple-knockout (TKO) mice における etoposide (mdr1 と mrp1 の基質)の脳内濃度に有意差がなかったことから (Wijnholds et al., 2000)、BBB における mrp1 の機能は低いことが示唆され、輸送担体のタンパク質発現量とその機能は良好な相関性を示すことが示された。従って、輸送担体のタンパク質発現量を明らかにすることは inner BRB における

個々の輸送担体の輸送活性と寄与を理解するうえで有用であると言える。

また、inner BRB と outer BRB における輸送担体の発現量を比較することで 2 つの BRB の機能の違いの解明につながり、網膜の中でも局所的な薬物送達を目指すうえで重要であると考えられる。更に、網膜特異的な薬物送達を目指すうえで、中枢関門である BBB や BCSFB との類似性・相違性を明らかにする必要がある。

本研究において、ヒトの目と構造的に類似性が高く、また網膜毛細血管と色素上皮細胞を分離して採取ができるだけの大きさがあるブタを用いることとした。ブタはラットやマウスなどに比べると大動物にあたり、大量の組織を採取できるだけでなく、欧米では臨床において薬物動態研究に多く用いられており、その輸送機構を解明することは創薬研究においても重要であると考えられる。そこで、本章では QTAP 法に基づき、inner BRB における輸送担体のタンパク質発現量を測定し、outer BRB・BBB・BCSFB と比較することで網膜への薬物送達に重要な輸送担体を解明することを目的とした。



## 第2節 ブタ inner BRB 粗膜画分における輸送担体タンパク質発現量解析

QTAP を用いて、ブタ inner BRB において 16 種類の ABC トランスポーター、13 種類の SLC トランスポーターを含む 32 種類のタンパク質絶対発現量の測定解析を行った。結果、BCRP, MDR1, MCT1, GLUT1, and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の 5 種のタンパク質が検出され、他の分子は定量限界以下であった(Table 4-1, 4-2)。

ABC トランスポーターのうち、BCRP のタンパク質発現量は 22.8 fmol/μg protein であり、MDR1 (8.70 fmol/μg protein) の 2.62 倍高い結果を示した。SLC トランスポーターのうち、4 つの MCT アイソフォームについて MCT1 のみが検出され (4.83 fmol/μg protein)、MCT2、3、4 のタンパク質発現量は定量限界以下であった(MCT2、3、4 の定量限界値はそれぞれ 0.275, 0.439, 0.251 fmol/μg protein である)。

### 第3節 ブタ inner BRB と outer BRB, BBB 及び BCSFB の比較解析

ブタ outer BRB 粗膜画分において8種類のタンパク質が検出された(Table 4-1)。一方、ブタ脳毛細血管(BBB)及び脈絡叢(BCSFB)の細胞膜画分においてはそれぞれ7、8種類のタンパク質が検出された(Table 4-1)。Inner BRB 及び outer BRB 両方において発現が検出された輸送担体はいずれも inner BRB の方が高いタンパク質発現量を示した。中でも BCRP の発現量は inner BRB は outer BRB の 8.3 倍と最も違いが大きく、BCRP の基質となる薬物は網膜外層に残留しやすいことが示唆された。Inner BRB 粗膜画分における MCT1 のタンパク質発現量は細胞膜画分である BBB の 3.00 倍であった。Inner BRB における輸送担体の発現パターンは BBB と最も高い類似性を示し( $R^2=0.8906$ )、次いで outer BRB ( $R^2=0.7988$ )、BCSFB ( $R^2=0.4730$ )の順であった(Figure 4-1)。Inner BRB における GLUT1 のタンパク質発現量(168 fmol/ $\mu$ g protein)は BBB の約 1/2 であった。MRP1 は全ての関門において検出されなかった。Sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT, SLC5A6)は outer BRB において 0.378 fmol/ $\mu$ g protein の発現量を示す一方、inner BRB においては定量限界以下であった。

**Table 4-1 Protein expression levels of transporters and marker protein in isolated porcine retinal capillary, retinal pigment epithelium, brain capillary and choroid plexus**

Molecular name	Protein expression level (fmol/ $\mu$ g protein) <sup>a</sup>			
	Retinal capillary (inner BRB)	Retinal pigment epithelium (outer BRB)	Brain capillary (BBB)	Choroid plexus (BCSFB)
	Crude membrane fraction		Plasma membrane fraction	
BCRP	22.8 $\pm$ 0.5	2.76 $\pm$ 0.55	58.9 $\pm$ 2.4	2.23 $\pm$ 0.22
MDR1	8.70 $\pm$ 0.40	2.01 $\pm$ 0.06	20.8 $\pm$ 1.7	4.55 $\pm$ 0.32
MCT1	4.83 $\pm$ 0.43	2.71 $\pm$ 0.39	1.61 $\pm$ 0.03	1.24 $\pm$ 0.15
GLUT1	168 $\pm$ 5	56.6 $\pm$ 5.0	300 $\pm$ 12	16.7 $\pm$ 1.0
SMVT	ULQ (<0.248)	0.378 $\pm$ 0.091	1.23 $\pm$ 0.18	0.921 $\pm$ 0.250
OATP3A1	ULQ (<0.297)	0.234 $\pm$ 0.023	0.235 $\pm$ 0.038	1.85 $\pm$ 0.17
MRP1	ULQ (<0.955)	1.03 $\pm$ 0.11	ULQ (<0.725)	1.53 $\pm$ 0.17
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase	53.7 $\pm$ 2.0	60.7 $\pm$ 4.6	148 $\pm$ 6	193 $\pm$ 9

<sup>a</sup>Crude membrane fractions were prepared from isolated porcine retinal capillaries and RPE. Plasma membrane fractions were prepared from isolated porcine brain capillaries and choroid plexus. The crude and plasma membrane fractions (50  $\mu$ g protein/sample  $\times$  4 samples = 200  $\mu$ g protein in total for isolated retinal RPE, brain capillary and choroid plexus, respectively; 50  $\mu$ g protein/sample  $\times$  1 sample = 50  $\mu$ g protein in total for isolated retinal capillary) were digested with Lys-C and trypsin, and injected into the nanoLC-TripleTOF5600 together with internal standard peptides result in four measurements of each tissue (single injection/sample  $\times$  4 samples for isolated retinal RPE, brain capillary and choroid plexus, respectively; 4 injections/sample  $\times$  1 sample for isolated retinal capillary). The target and the corresponding internal standard

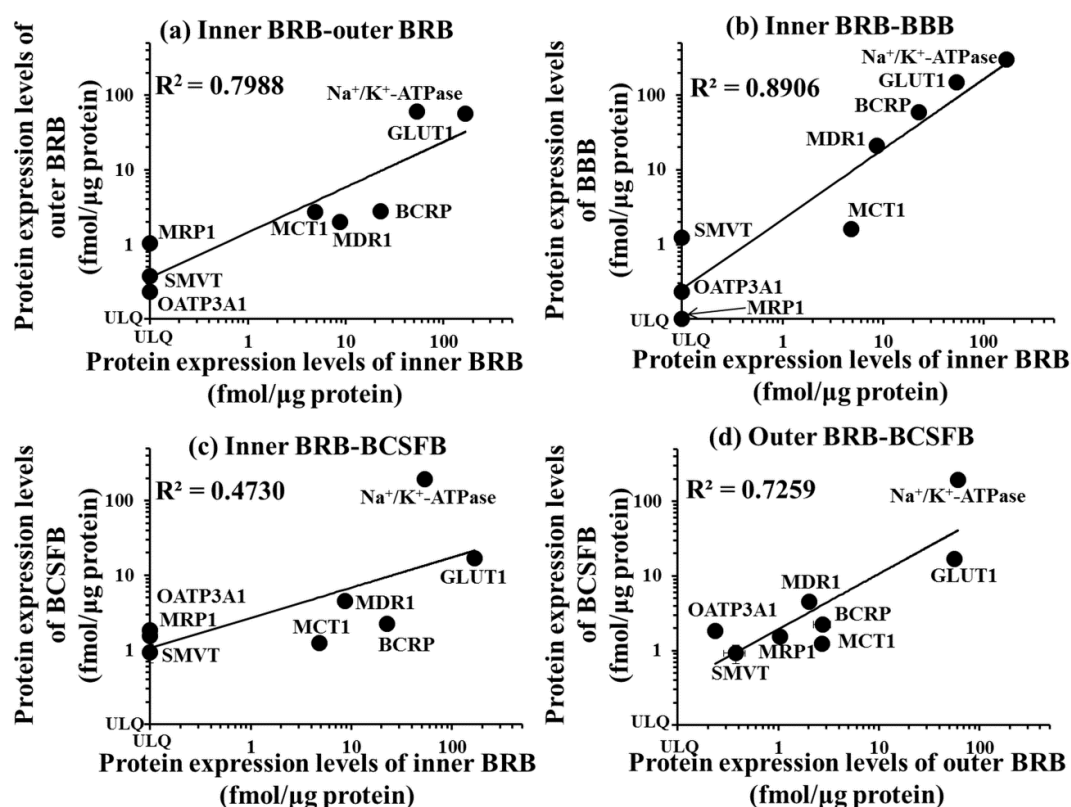
peptides were measured in the MRM-HS mode of TripleTOF5600. In data analysis using a MultiQuant software, the peak data of the peptides were extracted by four sets of PRM transitions per peptide pair (target peptide and the corresponding internal standard peptide), optimized prior to the experiment. If positive peaks were observed in three or four sets of transitions as defined in the Materials and Methods section, the protein expression levels were determined by taking the peak area ratios of target and internal standard peptides in each set of transition, and then averaged by using the values obtained from at least three PRM transitions in one measurement. Furthermore, the protein expression levels were calculated as an average of data obtained in four measurements. The protein expression levels were shown as the mean  $\pm$  SD in this table. “ULQ” represents under the limit of quantification. The unit of each value is fmol/ $\mu$ g protein. The values (fmol/ $\mu$ g protein) of the limit of quantification were shown in parentheses. BRB: blood-retinal barrier, BBB: blood-brain barrier, BCSFB: blood-cerebrospinal fluid barrier, BCRP: breast cancer resistance protein, MDR1: multiple drug resistance 1, MCT1: monocarboxylate transporter 1, GLUT1: glucose transporter 1, SMVT: sodium dependent multivitamin transporter, OATP3A1: organic anion-transporting polypeptide 3A1, MRP1: multidrug resistance-associated protein 1

**Table 4-2 Molecules under the limit of quantification**

Molecule name	LQ (fmol/μg protein) <sup>a</sup>			
	Retinal capillary (inner BRB)	Retinal pigment epithelium (outer BRB)	Brain capillary (BBB)	Choroid plexus (BCSFB)
ABC transporters				
ABC1	0.198	0.178	0.209	0.127
ABCA5	0.318	0.150	0.184	0.178
ABCA8+ ABCA10	1.60	1.22	1.15	1.06
BSEP	0.270	0.388	0.431	0.426
MRP2	0.542	0.546	0.590	0.529
MRP4	0.246	0.133	0.110	0.133
MRP5	0.153	0.152	0.150	0.159
SUR1+ SUR2	1.19	1.00	1.15	1.39
MRP7	0.914	0.881	0.877	0.833
White2	0.228	0.174	0.232	0.221
ABCG8	0.0407	0.0643	0.0565	0.0647
SLC transporters				
MCT2	0.275	0.218	0.458	0.339
MCT3	0.439	0.425	0.719	0.528
MCT4	0.251	0.182	0.287	0.250
OCT3	0.479	0.494	0.530	0.370
FATP1	0.620	0.514	0.617	0.592
ENT2	0.558	0.484	0.538	0.470
PMAT	0.396	0.326	0.375	0.371
ATA1	0.585	0.614	0.651	0.708
ATA3	0.533	0.470	0.539	0.545
Others				
Villin-1	0.809	0.773	1.12	1.02
RLIP76	0.553	0.537	0.633	0.617

<sup>a</sup>Molecules for which the protein expression levels were under the limit of quantification were shown. If no positive peak was observed or a positive peak(s) was only detected in one or two PRM transitions, the protein expression level was defined as under the limit of quantification (ULQ). The third most sensitive transition (based on the peak intensity of the internal standard peptide) was used to calculate LQ of the

target molecule. The values of limit of quantification (LQ) in each tissue were calculated with the unit of fmol/ $\mu$ g protein as described in 'Materials and methods', so that the values of LQ can be compared with the protein expression levels of the detected molecules described in Table 1.



**Figure 4-1 Comparisons of protein expression levels of transporter and marker protein in porcine tissue between (a) inner BRB and outer BRB, (b) inner BRB and BBB, (c) inner BRB and BCSFB, (d) outer BRB and BCSFB**

All data were taken from Table 1. Each point represents mean  $\pm$  S.D. “ULQ” represents under the limit of quantification. Each point for inner and outer BRB represents the protein expression level of target molecules in crude membrane fraction of isolated porcine retinal capillary and retinal pigment epithelium, and each point for BBB and BCSFB represents the protein expression level of target molecules in plasma membrane fraction of isolated porcine brain capillary and choroid plexus, with unit of fmol/ $\mu$ g

protein. The protein expression levels were calculated as an average of data obtained in four measurements of each tissue (single injection/sample  $\times$  4 samples for retinal RPE, brain capillary and choroid plexus, respectively; 4 injections/sample  $\times$  1 sample for retinal capillary). The line and  $R^2$  represent the correlation of transporters expression level patten between two samples in each comparison. BRB: blood-retinal barrier, BBB: blood-brain barrier, BCSFB: blood-cerebrospinal fluid barrier, BCRP: breast cancer resistance protein, MDR1: multiple drug resistance 1, MCT1: monocarboxylate transporter 1, GLUT1: glucose transporter 1, SMVT: sodium dependent multivitamin transporter, OATP3A1: organic anion-transporting polypeptide 3A1, MRP1: multidrug resistance-associated protein 1



#### 第4節 考察

本研究によってブタ inner BRB, outer BRB における輸送担体のタンパク質発現量が初めて明らかとなった。また、本研究の結果から、1) BCRP は inner BRB において網膜を光毒性の内因性や外因性物質から保護する主要な役割を担っていること、2) MCT1 が主に血液と網膜間の栄養物質(乳酸、ニコチン酸など)や monocarboxylate drugs(simvastatin など)の輸送を担っていることが示唆された。更に、inner BRB における輸送担体の発現パターンは BBB と最も類似性が高く、BCSFB と最も低いことが明らかとなった。

#### BCRP について

本研究において、ブタ inner BRB では BCRP が MDR1 の 2.62 倍高い発現量を示した。BCRP は inner BRB において luminal 側に発現し(Asashima et al., 2006)、pheophorbide a, protoporphyrin IX や fluoroquinolone antibiotics などの光毒性の内因性物質や外因性薬物を網膜から排出方向に輸送するとされている (Asashima et al., 2006, Jonker et al., 2002; Merino et al., 2006)。網膜は光毒性に対し非常に感受性が高く、網膜への損傷は網膜変性症や失明へとつながりうるため (Boulton et al., 2001; Roberts et al., 2001)、BCRP は inner BRB において網膜を潜在的な毒素から保護する重要な役割を担っている可能性が考えられる。近年、Ramirez らは、ヒトを含む 10 種の哺乳類の動物と比較して、ネコの BCRP でのみ 3 つのアミノ酸置換があることを明らかにした (Ramirez et al., 2011)。もしこれらの置換が BCRP の輸送機能に影響を与えるのであれば、fluoroquinolone 暴露によりネコ特異的に引き起こされる網膜変性や失明の原因を説明できるかもしれない (Wiebe et al., 2000; Gelatt et al., 2001)。実際に、ヒト及びネコの BCRP cDNA を導入した HEK 293 細胞株を用いた BCRP の基質である mitoxantrone と

BODIPY-prazosin の輸送実験では、ネコの BCRP を導入した細胞株における BCRP の排出活性は BCRP を導入していない control (mock)と同程度であった (Ramirez et al., 2011)。また、ネコの BCRP はヒトの BCRP と比較し enfloracin に起因する光毒性に対し最小の保護作用しか示さなかった (Ramirez et al., 2011)。これらの報告は、BCRP の欠損は網膜の光毒性への感受性を高める可能性を示し、少なくともブタにおいて BCRP は網膜の保護において重要な役割を示していることが示唆された。

一方、ラット網膜内皮細胞において、*bcrp* の mRNA の発現量は *Mdr1a* の約 1/4 低いことが報告されている (Hosoya et al., 2009)。また、*Mdr1a*<sup>-/-</sup>, *Mdr1b*<sup>-/-</sup>, *Bcrp*<sup>-/-</sup> (TKO)マウスにおいて、*Mdr1* の基質である [<sup>3</sup>H]verapamil の血液から網膜への輸送量は wild-type マウスの約 1.5 倍高いのに対し、*Bcrp* の基質では [<sup>3</sup>H]mitoxantrone の血液から網膜への輸送量は TKO マウスと wild-type マウスでは有意差を示さなかった (Chapy et al., 2015)。これらの結果は、げっ歯類の inner BRB において *bcrp* の役割は *mdr1* よりも小さいことが示唆された。

ヒト inner BRB での BCRP のタンパク質発現や機能については *in vivo* において未だ明らかにされていない。しかし、以下のことからヒト inner BRB における BCRP の発現を推察できると考えられる。まず、ブタの目は解剖学的、脈管構造、及び視細胞の分布などについてはヒトの目と類似しており、ヒトの網膜疾患研究において有用なモデル動物とされている (Prince et al., 1960; Simoens et al., 1992; Guduric-Fuchs et al., 2009; Ruiz-Ederra et al., 2005)。一方、げっ歯類の網膜は桿状細胞が多く、黄斑がなく、解剖学的にヒトの目と著しい相違性が見られる。また、ヒトの BBB において BCRP のタンパク質発現量は MDR1 よりも高く (Uchida et al., 2011)、ブタの BBB と同様な結果を示す一方、げっ歯類の BBB において *mdr1a* のタンパク質発現量は *bcrp* よりも高いことが報告されている

(Hoshi et al., 2013)。更に、本研究では、inner BRB 及び BBB における輸送担体の発現パターンは高い類似性を示すことを明らかにした (Figure 4-1)。以上のことから、ヒト inner BRB においても BCRP は MDR1 よりも高発現し、網膜保護において重要な役割を果たしていることが示唆され、網膜への薬物送達を考えるうえで MDR1 だけでなく、BCRP を介した排出機構をも考慮すべきであると考えられる。

### MCTs について

ニコチン酸は視覚機能維持に不可欠な栄養素であり、長期のニコチン酸の欠乏はペラグラや目の損傷を引き起こすことが知られている (Mathur, 1969)。一方、高用量のニコチン酸は網膜に対し有害な影響を及ぼすことも報告されており (Fraunfelder et al., 1995; Karakashian et al., 2001)、網膜におけるニコチン酸濃度の恒常性の維持は重要である。MCTs はニコチン酸を輸送することが知られているが (Simanjuntak et al., 1990; Tachikawa et al., 2011)、inner BRB におけるそれぞれの MCT アイソフォームの寄与は *in vivo* では未だ明らかにされていない。Light microscopic immunocytochemistry 解析によりラット inner BRB において mct2 は発現しておらず、mct1 は luminal 及び abluminal の両側に発現することが報告されているのに対し (Gerhart et al., 1999)、ラット inner BRB の不死化細胞株である TR-iBRB においては mct1, 2, 4 が mRNA レベルで発現していることが報告されている (Tachikawa et al., 2011)。本研究では、inner BRB において MCT1 のみが検出され、MCT2, 3, 4 のタンパク質発現量は定量限界以下であった。この結果から、inner BRB では主に MCT1 が血液から網膜へのニコチン酸の輸送を担っていることが示唆された。Simvastatin をはじめとするいくつかの脂溶性 HMG-CoA 還元酵素阻害薬は MCT1 の基質もしくは阻害となりうることが報告されており

(Tsuji et al., 1993)、これらの薬物の服用はニコチン酸の網膜への輸送を阻害する可能性がある。従って、これらの薬物の長期服用の際は適切な投与設計を行う必要があることが示唆された。

また、ラット *in vivo* の動態解析において、血液から網膜へのニコチン酸の輸送活性は血液から脳への輸送活性の約 3 倍であることが報告されている (Tachikawa et al., 2011)。更に、乳酸 (MCT1 の基質) の retinal uptake index 値は brain uptake index よりも高い (つまり、乳酸の血液から網膜への移行は血液から脳への移行よりも多い) ことも報告されている (Alm et al., 1985)。本研究において、粗膜画分 (細胞小器官膜 + 細胞膜) の inner BRB に加え粗膜画分の outer BRB における MCT1 のタンパク質発現量はより濃縮された細胞膜画分の BBB よりも高いことが明らかとなった (Table 1)。細胞膜マーカーである  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase で各画分の MCT1 の発現量を補正した結果、inner BRB, outer BRB における MCT1 はそれぞれ BBB の 8 倍、4 倍高い結果となった。このことから、血液から網膜へのニコチン酸や乳酸の輸送活性が血液から脳への輸送活性より大きいのは inner 及び outer BRB における MCT1 の高発現に起因することが示唆され、MCT1 を介した薬物輸送は脳や脊髄液よりも網膜に移行しやすく、網膜疾患治療の新規薬物送達経路の候補として有用であると考えられる。

### SMVT について

SMVT は outer BRB でのみ検出され、inner BRB においてそのタンパク質発現量は定量限界以下であった。SMVT はビタミンの一種であるビオチンの輸送担体として知られており、近年ニワトリの網膜において、ビオチンはグルタミン合成酵素等の活性に影響することが報告されている (Ohkura et al., 2010; Arunchaipong et al., 2009)。ビオチンは網膜で合成されないため、循環血液からの

供給で補う必要がある (Spector and Johanson; 2007)。ラット網膜血管内皮細胞において SMVT が mRNA レベルで発現していることが報告されているが (Ohkura et al., 2010)、本研究の結果から、outer BRB に発現する SMVT が主に網膜へのビオチン輸送を担うことが示唆された。また、SMVT はビオチン共役型プロドラッグを輸送することが報告されており (Vadlapudi et al., 2012; Vadlapudi et al., 2012; Janoria et al., 2009)、outer BRB の SMVT を介した薬物輸送が網膜外層の疾患への新しい治療戦略の候補となりうる可能性が考えられる。

#### QTAP 手法を用いたタンパク質発現量解析の限界について

本研究では、inner BRB と outer BRB において、Table 4-2 で示したようにそれぞれ 27、24 種類のタンパク質が定量限界以下であった。本研究において inner BRB と outer BRB の測定に粗膜画分を用いているが、細胞膜に局在する輸送担体については、他の細胞小器官膜を含む粗膜画分での濃度が低く、定量が困難であったことが原因の一つとして考えられる。それら検出できなかった分子についてはより細胞膜が濃縮された細胞膜を用いることで発現量を得られる可能性がある。加えて、以下に示す 2 つの可能性を無視できないため、それらのタンパク質発現量は粗膜画分において定量限界以下であるとは言い切れない。一つ目に、本研究の測定に用いたペプチド配列について、UniProtKB database (<http://www.uniprot.org/>) においてヒトでは標的ペプチドの変異や翻訳後修飾がないことを確認しているが、ブタにおいて変異などの情報はまだ不十分であり、未知の変異や修飾がある可能性がある。二つ目に、QTAP における solubilization や trypsinization, ionization など各ステップが全てのタンパク質について最適化されているわけではない。本研究室では過去にマウス脳毛細血管において glut1、MDR1-over-expressed cells においてヒト MDR1 について定量値と binding assays,

immunoblotting の結果に有意差がなかったことで solubilization 及び trypsinization の効率を検証している(Kamiie et al., 2008)。よって、これらの分子のサンプル調製の過程は真の絶対発現量を反映しうる効率で進行したと考えている。一方、タンパク質の発現量は方法やタンパク質ごとに変化する (Klammer et al., 2006; Brun et al., 2007; Brun et al., 2009; Proc et al., 2010; Balogh et al., 2013)。これに対し、denaturant の最適化による標的タンパク質のトリプシン消化効率が増加した例にあるように (Proc JL et al., 2010)、サンプル準備の各ステップを最適化することで、発現量の過小評価を回避できると考えられる。

#### 各関門における輸送担体のタンパク質発現量を比較する際に考慮すべき要因

本研究で得られた発現量 (fmol/ $\mu$ g protein) という値は各関門における輸送担体の発現量プロファイルを示すことはできるが、輸送活性を必ずしも反映していない。また、今回用いた組織は実体細胞の純度や cell type に関して同等ではない。よって異なるバリア間の活性を発現量レベルで比較するには次の3つのことを考慮する必要がある。

1) 脳やCSF、網膜中の基質濃度を実質的に支配しているのは 1 g whole tissue (cf. brain, choroid plexus, retina containing RPE) 中の実体細胞(e.g., brain capillary endothelial cells, choroid plexus epithelial cells, retinal capillary endothelial cells and retinal RPE cells) に発現する輸送担体の総量である。理論上、各関門の実体細胞の表面積と実体細胞の単位面積あたりに発現する輸送担体の発現量から算出することができる。しかし、実験操作上、whole tissue から crude cell fraction (isolated brain capillaries, isolated choroid plexus epithelial cells, isolated retinal capillaries, isolated retinal RPE) 及び whole cell lysate から plasma membrane fraction の2つの調製過程において実体細胞のロスが生じる可能性があるため、そのロスを考慮し

た以下の式(3)を用いることで1 g tissueあたりの発現量を算出するのが現実的である。すなわち、1 g whole tissueにおける標的輸送担体の絶対発現量 ( $E_T$  fmol/ g tissue)は $E_{T,PM} \times P_{PM}$  をwhole cell lysateからplasma membrane fractionの回収率A, 式(1)、whole tissue から crude entity cell fractionの回収率B, 式(2)で補正することによって算出される。

$$A = \frac{P_{PM} \times E_{M,PM}}{P_{CEF} \times E_{M,WC}} \quad (1)$$

$$B = \frac{P_{CEF} \times E'_{M,WC}}{P_{WT} \times E_{M,WT}} \quad (2)$$

$$E_T = E_{T,PM} \times P_{PM} \times \frac{1}{A} \times \frac{1}{B} \quad (3)$$

$P_{PM}$ : Crude entity cell fractionのplasma membrane fractionのタンパク量 ( $\mu\text{g protein}$ )

$E_{M,PM}$ : Crude entity cell fractionのplasma membrane fractionにおける各実体細胞 (brain capillary endothelial cell, choroid plexus epithelial cell, retinal capillary endothelial cell, retinal RPE cell)マーカー分子のタンパク質発現量 (fmol/ $\mu\text{g protein}$ )

$E_{M,WC}$ : Crude entity cell fractionのwhole cell lysateにおける各実体細胞の細胞膜マーカー分子のタンパク質発現量 (fmol/ $\mu\text{g protein}$ )

$P_{CEF}$ : Crude entity cell fractionのwhole cell lysateのタンパク量 ( $\mu\text{g protein}$ )

$E'_{M,WC}$ : Crude entity cell fractionのwhole cell lysateにおける各実体細胞マーカー分子のタンパク質発現量 (fmol/ $\mu\text{g protein}$ )

$P_{WT}$ : 1 g whole tissueあたりのwhole cell lysateのタンパク量 ( $\mu\text{g protein/g tissue}$ )

$E_{M,WT}$ : 1 g whole tissue のwhole cell lysateにおける各実体細胞のマーカー分子のタンパク質発現量 (fmol/ $\mu\text{g protein}$ )

$E_T$ : 1 g whole tissueにおける輸送担体の絶対発現量 (fmol/ g tissue)

$E_{T,PM}$ : Crude entity cell fractionのplasma membrane fractionにおける輸送担体のタンパク質発現量 (fmol/ $\mu$ g protein)

各補正のためのマーカー分子として、 $Na^+/K^+$ -ATPase (細胞膜マーカー)、PECAM1, von Willebrand factor (BBB)、AE2 (BCSFB)、CD31, Tie-2, claudin-5 (inner BRB), RPE65 (outer BRB)などが想定される。BBBについては本研究の結果に加え、マーカー分子の発現量が得られれば、補正は可能である。一方細胞膜で機能している以外にも、基質の関門透過と無関係な輸送担体が細胞小器官膜に存在する可能性を考えると、BRBについては粗膜画分ではなく、細胞膜画分での発現量解析が必要である。また、本研究では、網膜毛細血管と網膜色素上皮細胞 (RPE) は別々に採取している。式(2)はcrude cell fraction (isolated RPE)及び whole tissue (retina containing RPE)におけるマーカー分子のタンパク質発現量が必要である。従って、outer BRBの $E_T$ を算出するために、RPEを含む網膜の回収法を確立する必要がある。更に、本研究ではisolated brain capillaries, retinal capillaries 及び retinal RPEを測定したのに対し、isolated choroid plexus epithelial cellsではなく isolated choroid plexusを測定に用いた。従って、BCSFBの $E_T$ を算出するためには choroid plexus epithelial cellsの単離法を樹立する必要がある。

2) 次に考慮すべきは実体細胞の純度である。上記式においては目的の輸送担体がそれぞれの実体細胞にのみ発現することを仮定しているため、コンタミ細胞においても目的の輸送担体が発現している場合、実体細胞における発現量を過大評価してしまう。本研究において、ブタの脳毛細血管サンプルについてはニューロン、アストロサイトおよびペリサイトのコンタミを否定できない (Kubo et al., 2015)。過去の報告から、ブタ脳毛細血管サンプルにはアストロサイ



トがコンタミしており、アストロサイトにはBCRP, MDR1, GLUT1及びMCT1を発現することが報告されている (Leino et al., 1999; Zhang et al., 1999; Zhang et al., 2003; Leino et al., 1997)。しかし、それらの発現量は脳毛細血管と比較して非常に低く、ほとんどの輸送担体についてそのコンタミによる影響は小さいと考えられる。一方、脈絡叢には上皮細胞以外に結合組織、有窓性の血管などを含んでおり (Strazielle and Gherzi-Egea 2000)、有窓性の血管にはBCRPが低い発現量で発現していることが報告されている (Tachikawa et al., 2005)。網膜の毛細血管サンプルには網膜ペリサイト、Müller細胞、RPEサンプルには脈絡に存在する有窓性の血管をそれぞれコンタミネーションとして含む可能性がある。しかし、それらコンタミ組織における輸送担体の発現プロファイルは未だ不明である。

3)異なる cell typeにおいて未知の因子によって solubilization や trypsinization, ionization の効率が異なる可能性についても留意すべきである。これについては、同位体標識したタンパク質をトリプシン消化前に添加し、補正することがひとつの解決策として挙げられる。

本章ではブタ Inner BRB・Outer BRB・BBB・BCSFBにおける輸送担体のタンパク質発現プロファイルを明らかにし、inner BRBに発現する栄養供給輸送担体であるMCT1や内因性物質や薬物排出輸送担体であるBCRPは網膜における物質動態に重要であることが示唆された。今後、網膜への新規薬物送達法の開発には上記輸送担体の寄与を考慮する必要があると考えられる。

## 第5章 結論及び展望

本研究では、CSF 中薬物動態の解明、及び網膜への新規薬物送達経路の開拓を目指し、本研究室で樹立した QTAP 法に基づき、血液脳脊髄液関門・血液クモ膜関門・血液網膜関門における輸送担体タンパク質の絶対量を明らかにすること、およびこれまで能動的な機能を持たないとされてきた血液クモ膜関門について、水溶性有機アニオン系輸送担体に着目し、その機能を証明することを目的とし研究を行った。

CSF 中の薬物動態は、脳内の薬物動態にも影響しうる重要なファクターである。第2章では、これまで CSF 中薬物動態の制御機構とされてきた脈絡叢上皮細胞を実体とする BCSFB に着目し、ヒト及びラット脈絡叢における輸送担体タンパク質発現量プロファイルを明らかにした。QTAP を用いることによって、ラット脈絡叢では *oatp1a5* が他の有機アニオン系輸送担体より高発現していたことやヒト脈絡叢では新規に *MATE1* の発現量が明らかとなった。また、ヒトとラットで比較解析を行った結果、ラットでは発現量がヒトと類似している輸送担体もある一方、*PEPT2/pept2*、*OATP1A2/oatp1a5*、*MRP1/mrp1*、*OATP1C1/oatp1c1* など、BCSFB の機能として重要な役割を担う多くの輸送担体のタンパク質発現量が、ラットとヒトで顕著に差があることが示され、げっ歯類で測定された機能をそのままヒトに適応できる場合とそうでない場合があることが示唆された。

これまで、CSF 中薬物動態は脳室内に存在する BCSFB のみによって制御されているとされてきた。一方、脳室内の CSF 体積は CSF 全体積の 20% にも満たず約 80% の CSF は脳室から離れたクモ膜下腔に存在することから (Thorne et al., 2014)、BCSFB が全ての CSF、特にクモ膜下腔の CSF 中の薬物動態をも制御していると断定できないと考えた。また、CSF からの薬物の消失に BCSFB の寄与だけでは説明

できない事象が報告された。例えば、BCSFBではMdr1aとbcrpはCSF側細胞膜に発現している (Rao et al., 1999; Tachikawa et al., 2005)。mdr1a及びbcrp knockout miceを用いた研究では、wild typeと比較して脳実質への移行が上昇したのに対し、脳室のCSFへの移行が減少したことが報告されている (Shen et al., 2010)。これらの報告は、mdr1a及びbcrpはBCSFBにおいて血液からCSFへ基質を輸送することを示唆している。一方、mdr1及びbcrpの基質のそれぞれmdr1a/1b (-/-) knockout mice、bcrp (-/-) knockout miceにおけるCSF-plasma concentration ratio ( $K_{p,CSF}$ )はwild-type miceと比較して上昇することが報告されている(Kodaira et al., 2011)。Kodairaらの報告において、CSFはクモ膜下腔である大槽において採取されていることから (Kodaira et al., 2011)、クモ膜下腔には脈絡叢以外のCSFからの排出経路の存在を示唆していると考えた。第3章では、CSFに直接接するもう一つの関門でありながら、これまで「水溶性の物質を透過させず、能動的な機能を持たない」とされてきたBABに着目した。QTAPによってラットBABにおける輸送担体のタンパク質発現量プロファイルを明らかにし、脈絡叢とは異なる輸送担体発現を有していることが明らかとなった。また、機能解析を行うために、これまで用いられてきた脈絡叢の寄与を回避できない脳室内投与法に代わり、新規にBABの機能のみを評価できる大槽内投与法を樹立した。大槽内投与法を用いて、BABのみに発現し細胞への拡散や吸着が少ない水溶性有機アニオン系薬物の輸送担体であるoat1に着目し、その典型的な基質であるPAHを用いて動態解析を行った。結果、PAHはBABに発現するoat1, oat3によって積極的にCSFから排出され、また概算されるoat1とoat3の寄与率はそれぞれ83%、17%であり、oat1が主にクモ膜下腔おCSFからのPAHの消失に寄与していることが示唆された。また、oat1タンパク質は脈絡叢において検出されなかったため、このoat1を介したCSF腹の排出機構はクモ膜特有の機能であることが示唆された。CSFの産生や吸収に

についても再考が必要としている今、血液クモ膜関門は物理的な障壁だけでなく、能動的な関門として機能しCSF総体積の約8割を占めるCSF中薬物動態に大きく寄与することが示唆されたことから、CSF中の薬物動態におけるクモ膜上皮細胞の役割を根本的に見直す必要があると考えられる。近年、提唱されているCSF動態の概念の一つに“Glymphatic pathway”があり、一説では「脳表クモ膜下腔のCSFが動脈周囲腔から脳実質に入り、脳の間質を灌流してから、静脈周囲腔から排泄され脳表クモ膜下腔に戻る」と考えられている(Iliff et al., 2012; Xie et al., 2013)。また、アルツハイマー病患者の脳において、A $\beta$ タンパクが毛細血管から脳表クモ膜下腔の動脈周囲の血管周囲腔に選択的に蓄積することが報告されており、このA $\beta$ 蓄積によるlymphatic drainageの障害が脳実質のA $\beta$ 蓄積をさらに増悪させるという病態発現機序が提唱されている (Weller et al., 2008; Weller et al., 2009; Weller et al., 2010)。本研究によって、BABが能動的にクモ膜下腔CSFからの物質の排出に寄与していることが明らかにされたことから、脳間質に蓄積したA $\beta$ がCSFによって還流され脳表クモ膜下腔CSFに戻り、BABを介して血中に排出されるという新たな脳内A $\beta$ の排除機構が存在する可能性が考えられる。今後、A $\beta$ タンパクを用いた動態解析やA $\beta$ 輸送を担うLRP1, 2のBABにおける発現解析を行うことによって、A $\beta$ の脳内動態におけるBABの機能の解明につながると考えられる。

第4章では、ヒトの目と類似性が高く、サンプル調製できるだけの量があるブタの網膜を用いて、2つの血液網膜関門 (inner BRB, outer BRB)、特に網膜の栄養供給の2/3を担うinner BRBに着目し、輸送担体のタンパク質発現量を明らかにし、BCRPが網膜における物質動態に重要であることが示唆された。また、中枢関門であるBBB、BCSFBと比較解析することで、MCT1を介した薬物輸送は網膜特異的な薬物送達経路となりうる可能性が考えられる。

以上、本研究によって血液脳脊髄液関門、血液クモ膜関門、血液網膜関門における輸送担体タンパク質発現量を明らかにした。また、*in vivo* 動態解析によって、血液クモ膜関門は水溶性の物質を透過させることができ、クリアランスシステムとして機能し、CSF 中の薬物動態を制御していることを証明した。

アルツハイマー病をはじめとする中枢疾患や糖尿病性網膜症などの網膜疾患における治療満足度が未だ低く、その原因の一つとして中枢や網膜に存在する複数の関門が循環血液から目的組織への薬物の移行を制限していることが考えられる。本研究で得られた輸送担体のタンパク質発現量に加え、今後各関門における輸送担体の細胞膜局在性、輸送方向性、タンパク質当たりの輸送活性、関門間の影響を明らかにすることで、血液を介した中枢や網膜への薬物送達経路の開拓につながりうると考えられる。

## 第 6 章 試薬及び実験方法

### 第 1 節 試薬

#### タンパク質関連試薬

Albumin from Bovine Serum (BSA)	Wako pure chemical industries, Osaka, Japan
DC-protein assay kit	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
(±)-Dithiothreitol (DTT)	Wako pure chemical industries
Guanidine hydrochloride	Wako pure chemical industries
Iodoacetamide (IAA)	Wako pure chemical industries
Trizma base	Sigma Chemical Co
Protease MAX <sup>TM</sup> surfactant, Trypsin Enhancer	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Lysyl Endopeptidase (Lys-C)	Wako pure chemical industries
Trypsin	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Urea	Boehringer Mannheim GmbH, German
GL-Tip GC	GL Science
GL-Tip SDB	GL Science
Protease inhibitor cocktail	Sigma Chemical
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma Chemical

#### 動物実験関連試薬

Isoflurane	Intervet
Xylazine	Sigma Chemical Co, St Louis, Mi
Ketalar	
Acid Phosphatase from wheat germ	Sigma Chemical Co, St Louis, Mi
Para-aminohippuric acid	Wako pure chemical industries, Osaka, Japan
Famoditine	Sigma Chemical
Rhodamine 123	Sigma Chemical
Ceftriaxone Disodium Salt Hemiheptahydrate	Wako pure chemical industries, Osaka, Japan
Inulin-FITC	Sigma Chemical

#### ウエスタンブロット関連試薬

ECL Prime Western Blotting Detection System

GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

30% acrylamide/Bis solution 29:1 (3.3% C)

Bio-Rad, Hercules, USA

Anti-Rabbit IgG-HRP Antibody

MP Biomedicals, Inc

#### 免疫染色関連試薬

Rabbit anti-SLC22A6 antibody

Abcam

Goat anti-rabbit IgG Alexa 488

Life technologies Co, MA, USA

DAPI

Sigma Chemical Co, St Louis, Mi

#### 定量用ペプチドプローブ

LC-MS/MS を用いた、タンパク質の定量に用いた標準および内部標準ペプチドは、Thermo-electron Corporation (Sedanstrabe, Germany)または SCRUM Inc. (Tokyo, Japan)から購入した。ペプチドの純度は 95 %以上のものを用いた。Peptide 溶液の濃度は HPLC-UV を用いたポストカラム誘導体化法 (ニンヒドリン法)に基づくアミノ酸分析法により決定した (LaChrom Elite, Hitach, Tokyo, Japan)。

#### 実験動物

Wistar 系ラット(雄性 10 週齢)は、日本 SLC(Hamamatsu, Japan)から購入した。東北大学大学院薬学研究科動物舎で自由に水及び標準固形飼料 CRF-1 (Charles Liver)を摂取させて飼育した。実験動物の取り扱いについては、東北大学薬学部動物実験委員会が作成した「実験動物取り扱いに関する指針」に従って行った。全ての実験は、実験動物実験動物の取り扱いについて動物管理使用委員会の了承を得た後、実験動物中央研究所が定める、ガイドラインに従って行われた。

#### その他の試薬

LC-MS/MS の移動相には LC-MS グレードの acetonitrile (Wako pure chemical industries, Osaka, Japan)を用いた。その他の試薬は特に記載が無い限り、いずれも市販の特級品を用いた。

## 第2節 ラット及びヒト脈絡叢における輸送担体タンパク質発現量解析

### Human choroid plexus

A frozen human choroid plexus, freshly isolated from the fourth ventricle at 5 h 6 min postmortem (donor information: 92 years old, Caucasian, male, diagnosed with depression and dementia, and cardiovascular abnormality as the cause of death) was purchased from Analytical Biological Services (Wilmington, DE, USA). The protocols for the present study were approved by the Ethics Committee of the Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University.

### Preparation of plasma membrane fractions

Rat choroid plexuses were freshly isolated on ice from lateral, third and fourth ventricles of Wistar rats (0.19 g of wet tissues pooled from 30 males), after decapitation under anesthesia induced with isoflurane. The frozen human choroid plexus was thawed on ice (about 0.7–0.8 g wet tissue). The choroid plexuses were dissected on ice, and then homogenized by 15 up-and-down rotated strokes (1,000 rpm) using a Potter-Elvehjem homogenizer in 40 mL of hypotonic buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and a protease inhibitor cocktail (1% (v/v), Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)] per g wet tissue of choroid plexus on ice. After kept on ice for 30 min, the homogenates were homogenized again with 20 up-and-down rotated strokes (1,000 rpm) on ice, and then subjected to nitrogen cavitation at 450 psi for 15 min at 4°C. Subsequently, the homogenates were centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C, and the supernatants were centrifuged again at 10,000 g for 10 min at 4°C to remove the debris as much as possible. After the resultant supernatants were centrifuged at 100,000 g for 40 min at 4°C, the pellets were suspended in suspension buffer (10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.25 M sucrose) and layered on top of a 38% (w/v) sucrose solution and centrifuged at 100,000 g for 40 min at 4°C. The turbid layer at the interface was recovered, suspended in suspension buffer, and centrifuged at 100,000 g for 40 min at 4°C. The resultant pellets were suspended in the suspension buffer to obtain the plasma membrane fractions. Protein concentrations were measured by the Lowry method using the DC protein assay reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), and the recovery rates of plasma membrane fractions were 1063 µg protein/g wet tissue of choroid plexus in rat. The plasma membrane fractions were stored at



–80°C.

#### Lysyl endopeptidase and trypsin digestion

The plasma membrane fractions (50 µg protein/sample) were suspended in denaturing buffer (7 M guanidine hydrochloride, 500 mM Tris–HCl (pH 8.5) and 10 mM EDTA) to solubilize and denature proteins, and treated with dithiothreitol at room temperature for 60 min followed by the treatment of iodoacetamide at room temperature for 60 min in darkness to reduce and alkylate the proteins. The proteins were purified by a methanol-chloroform precipitation method. The resultant protein precipitates were dissolved in urea buffer (6 M urea and 100 mM Tris–HCl (pH 8.5)), diluted fivefold with 100 mM Tris–HCl (pH 8.5), and sonicated in an ultrasonic bath containing ice to completely dissolve the precipitates. ProteaseMax surfactant (Promega, Madison, Wisconsin) and lysyl endopeptidase (LysC; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) were added at 0.05% final concentration and an enzyme/substrate ratio of 1:100, respectively, and incubated at room temperature for 3 h, followed by the digestion with TPCK-treated trypsin (Promega) at an enzyme/substrate ratio of 1:100 at 37°C for 16 h. The peptide samples were acidified with trifluoroacetic acid.

#### Clean-up of peptide samples for LC-MS/MS analysis

For the calibration curve, the tryptic digests obtained from the 10 µg protein of *E. coli* lysate were spiked with standard peptides (0, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000, or 2000 fmol for the points of 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 50, 100, or 200 fmol/µg protein, respectively) and 500 fmol of internal standard peptides. For the choroid plexus, the tryptic digests obtained from the 10 µg protein of plasma membrane fractions were spiked with 500 fmol of internal standard peptides. Both samples were cleaned up by using GL-tip GC and SDB (GL science Inc., Tokyo, Japan) according to the manufacturer's protocol. The resultant solutions eluted from GL-tip GC and SDB were evaporated by centrifugation under vacuum for 1 h with CC-105 centrifugal concentrator (low heat mode; TOMY, Tokyo, Japan), and the residues were reconstituted in 0.1% formic acid/water. One-tenth volume was used for an injection to the LC-MS/MS system: theoretically, each injection for the calibration curve included 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 50, 100, or 200 fmol of standard peptides, 50 fmol of internal standard peptides and the tryptic digest equivalent to 1 µg protein of *E. coli* lysate, and each injection for the choroid plexus

sample included 50 fmol of internal standard peptides and the tryptic digest equivalent to the 1 µg protein of plasma membrane fraction, when we assumed that there was no loss of peptides during the clean-up.

#### Multiplexed selected/multiple reaction monitoring (SRM/MRM) in nanoLC-TripleTOF5600 system

The LC-MS/MS system consisted of a NanoLC-Ultra 1Dplus system (Eksigent Technologies, Dublin, CA, USA) coupled with cHiPLC-nanoflex system (Eksigent Technologies) and TripleTOF5600 (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) equipped with NanoSpray III ion source (AB SCIEX). Mobile phases A and B consisted of 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in acetonitrile, respectively. The cleaned peptide samples were directly loaded onto a Nano cHiPLC 75 µm x 15 cm ReproSil-Pur C18-AQ 3 µm 120Å column (Eksigent Technologies) with the injection amounts corresponding to 1 µg protein as described above without a trap column. The peptides were separated and eluted from the column at 300 nL/min of flow rate with 120 min of total run time and a linear gradient as follows (mobile phase A : B); 100:0 for 40 min after injection for sample loading, 60:40 at 80 min, 0:100 at 81 min and up to 90 min, 100:0 at 90.1 min and up to 120 min. The eluted peptides were sprayed from a SilicaTip emitter (NEW OBJECTIVE, Woburn, MA, USA) and positively ionized with an electrospray ionization in the NanoSpray III ion source of TripleTOF5600. The source/gas parameters were as follows; ion source gas 1 (20 psi), curtain gas (20 psi), ion spray voltage floating (2300 V), interface heater temperature (150°C). The unlabeled and stable-isotope labeled peptides were measured in a MRM high-sensitivity (MRM-HS) mode of TripleTOF5600. The m/z values of Q1 listed in the supplemental tables 1 and 2 were set to measure the target peptides. The declustering potential was 80 V. The collision energy optimized for each peptide as described below was used. The collision energy spread was 0 V. The product ions were scanned with a MS/MS range of 100 to 1600 m/z. 20 peptides including 10 unlabeled and the corresponding 10 stable-isotope labeled ones were simultaneously measured at maximum in a run. The accumulation time was 0.05 second for each target peptide, and therefore the cycle time was 1 second in case of the simultaneous measurement of 20 peptides. Auto calibrations with beta-galactosidase were performed every 4 runs.

MultiQuant software (AB SCIEX) was used for data analysis. The four SRM/MRM transitions

optimized as described below were used to extract data of the target peptide and quantify it (Supplemental tables 1 and 2). These four SRM/MRM transitions for each peptide consisted of the  $m/z$  value of precursor ion and the  $m/z$  range of  $m/z \pm 0.025$  for the four product ions. Peak was defined as positive when the peak intensity ratio of signal and noise (S/N) and the peak area were higher than 3 and 1000 counts for the signal peaks detected at the same retention time as those of the internal standard peptides, respectively. When positive peaks were observed in the three or four SRM/MRM transitions, the protein was considered to be expressed in the choroid plexus, and the amounts (fmol) of the target peptides were calculated as an average of the quantitative values from the three or four SRM/MRM transitions, unless otherwise noted in the table 1. The protein expression levels (fmol/ $\mu$ g protein) of target proteins in the plasma membrane fractions of choroid plexus were calculated by dividing the amounts (fmol) of the target peptides by the total protein amounts of choroid plexus plasma membrane fraction examined (1  $\mu$ g protein). The protein expression levels were finally determined as an average of those obtained in multiple measurements.

#### Calculation of protein expression levels

In the present study, preparation of plasma membrane fractions from choroid plexuses was performed once for rat samples and twice for the human sample. For each species, three aliquots (50  $\mu$ g protein each) of the prepared plasma membrane fractions were subjected to LysC and trypsin digestion. Using these three samples, most of the target molecules were measured by LC-MS/MS three times, i.e., [single injection/sample  $\times$  three samples]. Exceptionally, rat glut1, oat3, mrp1, mrp4, mct1, mct3, lat2, 4f2hc and ae2 were measured only once (single injection/sample  $\times$  only one of the three rat samples), and rat rfc1 and oatp1c1 were measured twice (single injection/sample  $\times$  two of the three rat samples). For each measurement, the target peptide was considered to exist in the sample if positive peaks were observed in three or four SRM/MRM transitions as defined above, and then the amount (fmol) of the target peptide was calculated from the peak area ratio (target peptide/the corresponding internal standard peptide) and calibration curve for each transition showing a positive peak. Subsequently, the protein expression level (fmol/ $\mu$ g protein) of the corresponding target protein in the plasma membrane fractions of choroid plexus was calculated for each transition by dividing the amount (fmol) of the target peptide by the total protein amount of choroid plexus plasma membrane fraction

examined (1 µg protein). Therefore, in one measurement, three or four values of the protein expression level were obtained for each protein that was defined as expressed according to the above criterion. Finally, the values in the three measurements (one or two measurements for some molecules, as described above) were used to calculate the average, which is given in Table 2-1. In this calculation of the average, the minimum and maximum numbers of individual values used were four and twelve, respectively. Rat *bcrp*, *mdr1a*, and *crt1* were measured three times, but positive peaks were observed in only two SRM/MRM transitions in each measurement. Exceptionally, the protein expression levels of these molecules were calculated by using these six values (two transitions/measurement × three measurements). However, these expression levels are given for reference purposes only, and are not necessarily quantitatively accurate, since there were only two transitions per measurement.

#### Calculation of the limit of quantification

If no positive peak was observed or the positive peak(s) was only detected in one or two SRM/MRM transitions, the protein expression level was defined as under the limit of quantification (ULQ) unless otherwise noted, and the limit of quantification (LQ, fmol/µg protein) was calculated as follows: the third most sensitive SRM/MRM transition among four ones, which was based on the peak intensity of internal standard peptide, was used to calculate LQ of target molecule. The peak area (counts) which gives the S/N ratio of 3 in peak intensity in the choroid plexus sample ( $PA_{S/N3,CP}$ ) was calculated by eqn 1 from the intensity (cps) of background noise ( $I_{Noise}$ ), the peak area (counts) and intensity (cps) of internal standard peptide in the choroid plexus sample ( $PA_{IS,CP}$  and  $PI_{IS,CP}$ , respectively). When  $PA_{S/N3,CP}$  was more than 1000 counts,  $PA_{S/N3,CP}$  was used as a peak area for the calculation of LQ ( $PA_{LQ}$ ). By contrast, when  $PA_{S/N3,CP}$  was less than 1000 counts, 1000 counts was used as  $PA_{LQ}$ . When the calibration curve was obtained with eqn 2, the amount (fmol) of target protein equivalent to LQ ( $A_{Target\ eq\ LQ}$ ) was calculated by means of eqn 3 from  $PA_{LQ}$ ,  $PA_{IS,CP}$  and the values of slope and intercept in eqn 2. Then, LQ was obtained with eqn 4 by dividing  $A_{Target\ eq\ LQ}$  by the total protein amount of choroid plexus plasma membrane fraction examined ( $A_{CP}$ , 1 µg protein).

$$PA_{S/N3,CP} = I_{Noise} \times 3 \times PA_{IS,CP} / PI_{IS,CP} \quad (1)$$

$$PA_{ST,Authentic} / PA_{IS,Authentic} = (Slope \times A_{ST,Authentic} + Intercept) \quad (2)$$

$$A_{Target\ eq\ LQ} = (PA_{LQ} / PA_{IS,CP} - Intercept) / Slope \quad (3)$$

$$LQ = A_{\text{Target eq LQ}} / A_{\text{CP}} \quad (4)$$

where  $PA_{\text{ST,Authentic}}$  and  $PA_{\text{IS,Authentic}}$  are the peak areas (counts) of standard peptide and internal standard peptide in authentic samples, respectively, and  $A_{\text{ST,Authentic}}$  is the amount (fmol) of standard peptide in authentic samples.

#### Setup of SRM/MRM conditions of target peptides

Prior to the quantitative analysis of choroid plexus sample by nanoLC-TripleTOF5600, the SRM/MRM conditions of target peptides including the four transitions (Table S2-1 and 2) and collision energies were set up as follows.

For most peptides, the four SRM/MRM transitions have been reported in the previous studies using the AB SCIEX triple quadrupole mass spectrometers 4000QTRAP, API5000 or QTRAP5500 (Kamiie et al., 2008, Shawahna et al., 2011, Hoshi et al., 2013, Uchida et al., 2011, Ohtsuki et al., 2011). Therefore, the reported four transitions were taken for the present study using the TripleTOF5600 by changing the  $m/z$  values of Q3 to the  $m/z$  ranges of  $m/z \pm 0.025$  for the product ions. The optimized value of collision energy for the most sensitive transition in the triple quadrupole mass spectrometers was used for the four transitions in the TripleTOF5600 commonly.

For the other peptides for which the four SRM/MRM transitions have not been reported, the SRM/MRM transitions and collision energies were optimized by using the TripleTOF5600 in the present study, or set up for the TripleTOF5600 as described above by using the unpublished SRM/MRM conditions optimized in either 4000QTRAP, API5000 or QTRAP5500 for the other projects of our laboratory. The optimization in TripleTOF5600 was performed by either one of the following two methods; 1, four SRM/MRM transitions and a collision energy for a target peptide were determined from MS/MS spectra obtained by direct infusion of 1  $\mu\text{M}$  peptide solution at a flow rate of 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  into the TripleTOF5600 so that the highly sensitive SRM/MRM condition can be obtained. 2, the target peptides were measured by the MRM-HS mode in the nanoLC-TripleTOF5600 system with the same condition as the measurements of choroid plexus samples while the values of collision energy were changed every runs (15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 V). In each run, four product ions per peptide giving strong signals were selected as candidates for four SRM/MRM transitions. The collision energy in which the average intensity of the selected four product ions was the highest among those in the different

collision energies was selected as an optimal one for the target peptide. The four product ions in the optimal collision energy were selected for the four SRM/MRM transitions of target peptide.

For all of the internal standard peptides, the SRM/MRM transitions corresponding to those of the standard peptides and the same collision energies as the standard peptides were selected.

#### Statistical analysis

An F-test was performed to assess the equality of variance between two groups. According to the result of the F-test, Student's t- test (equal variance) or Welch's test (unequal variance) was performed to determine the statistical significance of differences between two groups. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

TableS2-1 Peptide Probes and SRM/MRM transitions for rat molecules.

Gene Symbol	Alias	Genbank Accession Number	St or Is	Probe Sequence	Number of AA	Position of stable isotope-labeled AA from N-terminal	Stable isotope-labeled AA	SRM/MRM transition				
								Q1 (m/z)	TOF range (m/z ± 0.025)			
									1	2	3	4
ABC family												
Abca1	Abc1	NP_835196	St	FVSPLSWDLVGR	12	-	-	688.4	1129.600	1042.568	832.431	945.515
			Is	FVSPLSWDLVGR	12	9	L	691.9	1136.617	1049.585	839.448	952.533
Abca2	Abc2	NP_077372	St	LLFGPLPDLGK	12	-	-	642.9	1058.552	911.484	757.409	432.245
			Is	LLFGPLPDLGK	12	9	L	646.4	1065.569	918.501	764.426	439.263
Abca3	Abc3	XP_001054650	St	VFQVGNK	7	-	-	396.2	692.373	545.304	318.177	417.246
			Is	VFQVGNK	7	4	V	399.2	698.387	551.318	318.177	423.260
Abca4	Abc4	NP_001101191	St	WIAEPAR	7	-	-	421.7	656.373	543.289	343.209	175.119
			Is	WIAEPAR	7	6	A	423.7	660.380	547.296	347.216	175.119
Abca5	Abca5	NP_775429	St	NAVVPIK	7	-	-	370.7	357.250	555.387	456.318	626.424
			Is	NAVVPIK	7	6	I	374.2	364.267	562.404	463.335	633.441
Abca7	Abca7	NP_997481	St	QFQSPLR	7	-	-	438.2	385.256	600.347	472.288	747.415
			Is	QFQSPLR	7	6	L	441.7	392.273	607.364	479.305	754.432
Abca8a	Abca8a	NP_001268753	St	DLTLDVYK	8	-	-	483.8	738.403	637.356	524.272	310.176
			Is	DLTLDVYK	8	6	V	486.8	744.417	643.369	530.285	310.176
Abca12	Abca12	XP_001054709	St	LLAIPPDNR	10	-	-	561.3	711.379	501.242	824.463	614.326
			Is	LLAIPPDNR	10	7	P	564.3	717.392	507.255	830.476	620.340
Abcb1a	Mdr1a	NP_596892	St	NTTGALTTR	9	-	-	467.8	618.357	719.405	490.299	561.336
			Is	NTTGALTTR	9	6	L	471.3	625.374	726.422	497.316	568.353
Abcb11	Bsep	NP_113948	St	STALQLIQR	9	-	-	515.3	529.346	657.404	841.526	770.489
			Is	STALQLIQR	9	6	L	518.8	536.363	664.422	848.543	777.506
Abcc1	Mrp1	NP_071617	St	TPSGNLVNR	9	-	-	479.3	759.411	672.379	501.314	615.357
			Is	TPSGNLVNR	9	6	L	482.8	766.428	679.396	508.332	622.375
Abcc4	Mrp4	NP_596902	St	APVLFFDR	8	-	-	482.8	584.283	697.367	796.435	893.488
			Is	APVLFFDR	8	4	L	486.3	584.283	704.384	803.452	900.505
Abcc5	Mrp5	NP_446376	St	SLSEASVAVDR	11	-	-	567.3	646.352	717.389	933.464	559.320
			Is	SLSEASVAVDR	11	2	L	570.8	646.352	717.389	933.464	559.320
Abcc6	Mrp6	NP_112275	St	SLLWDVAR	8	-	-	480.3	759.415	646.331	460.251	345.225
			Is	SLLWDVAR	8	3	L	483.8	766.432	646.331	460.251	345.225
Abcc10	Mrp7	NP_001101671	St	SEGAVALHVYR	11	-	-	601.3	985.558	928.536	857.499	758.431
			Is	SEGAVALHVYR	11	7	L	604.8	992.575	935.554	864.516	765.448
Abcg1	White	NP_445954	St	ELDVENAK	8	-	-	459.2	675.331	560.304	461.236	332.193
			Is	ELDVENAK	8	7	A	461.2	679.338	564.311	465.243	336.200
Abcg2	Bcrp	NP_852046	St	SLLDVLAAAR	10	-	-	522.8	644.373	757.457	529.346	430.277
			Is	SLLDVLAAAR	10	7	L	526.3	651.390	764.474	536.363	437.295
Abcg5	Abcg5	NP_446206	St	TTLLDAISGR	10	-	-	523.8	844.489	731.405	618.321	503.294
			Is	TTLLDAISGR	10	4	L	527.3	851.506	738.422	618.321	503.294
SLC family												
Slc1a2	Eaat2	NP_001030310	St	SELDTIDSQHR	11	-	-	650.8	642.295	971.454	856.427	527.269
			Is	SELDTIDSQHR	11	3	L	654.3	642.295	971.454	856.427	527.269

Slc1a4	Asct1	NP_942058	St	ETVDSFLDLLR	11	-	-	654.3	629.398	978.526	776.467	516.314
			Is	ETVDSFLDLLR	11	10	L	657.8	636.415	985.543	783.484	523.331
Slc2a1	Glut1	NP_620182	St	TFDEIASGFR	10	-	-	571.7	537.278	894.432	779.405	650.362
			Is	TFDEIASGFR	10	6	A	573.7	541.285	898.439	783.412	654.369
Slc3a2	4f2hc	NP_062156	St	VAGSPGWVR	9	-	-	464.8	758.395	614.341	829.432	315.167
			Is	VAGSPGWVR	9	9	R	469.8	768.403	624.349	839.440	315.167
Slc6a2	Net	CAA73665	St	TADLLVVK	8	-	-	429.8	757.482	686.445	345.250	246.181
			Is	TADLLVVK	8	5	L	433.3	764.499	693.462	345.250	246.181
Slc6a6	Taut	NP_058902	St	EGATPFHSR	9	-	-	501.2	643.331	546.278	399.210	262.151
			Is	EGATPFHSR	9	6	F	506.2	653.358	556.306	399.210	262.151
Slc6a8	Crt1	NP_059044	St	GDGPAGLGAPSSR	13	-	-	571.3	574.294	446.236	744.400	568.273
			Is	GDGPAGLGAPSSR	13	13	R	576.3	584.303	456.244	754.408	568.273
Slc6a12	Bgt1	NP_059031	St	QELIAWEK	8	-	-	508.8	759.440	646.356	533.272	462.235
			Is	QELIAWEK	8	5	A	510.8	763.447	650.363	537.279	462.235
Slc7a5	Lat1	NP_059049	St	VQDAFAAAK	9	-	-	460.7	693.357	360.224	578.330	821.415
			Is	VQDAFAAAK	9	7	A	462.7	697.364	364.231	582.337	825.422
Slc7a8	Lat2	NP_445894	St	GEFFWLEPK	9	-	-	576.8	672.372	819.440	373.208	966.509
			Is	GEFFWLEPK	9	6	L	580.3	679.389	826.457	373.208	973.526
Slc10a1	Ntcp	NP_058743	St	GIYDGLK	8	-	-	440.7	710.336	260.197	547.272	432.245
			Is	GIYDGLK	8	7	L	444.2	717.353	267.214	554.290	439.263
Slc10a2	Asbt	NP_058918	St	LAGQPWYR	8	-	-	495.8	877.432	806.395	621.314	524.262
			Is	LAGQPWYR	8	5	P	498.8	883.445	812.408	627.328	524.262
Slc15a2	Pept2	NP_113860	St	DYGVSAAYR	8	-	-	465.7	652.341	496.251	336.119	279.098
			Is	DYGVSAAYR	8	8	R	470.7	662.350	506.260	336.119	279.098
Slc16a1	Mct1	NP_036848	St	SDANTDLIGGSPK	13	-	-	637.8	887.484	786.436	558.325	445.241
			Is	SDANTDLIGGSPK	13	7	L	641.3	894.501	793.453	558.325	445.241
Slc16a8	Mct3	NP_113932	St	AVSVFFR	7	-	-	413.2	655.356	469.256	568.324	754.425
			Is	AVSVFFR	7	6	F	418.2	665.383	479.283	578.351	764.452
Slc19a1	Rfc1	NP_001030309	St	DSFLVR	6	-	-	368.7	387.272	534.340	175.119	274.187
			Is	DSFLVR	6	6	R	373.7	397.280	544.348	185.127	284.196
Slc21a2	Pgt	XP_006243717	St	IFVDYGR	7	-	-	435.2	756.368	609.299	510.231	395.204
			Is	IFVDYGR	7	3	V	438.2	762.381	615.313	510.231	395.204
Slc21a1	Oatp1a1	NP_058807	St	FTFLPK	6	-	-	631.3	234.145	977.516	599.315	800.417
			Is	FTFLPK	6	6	K	635.3	242.159	985.531	607.329	800.417
Slc21a7	Oatp1a5	NP_110465	St	EGLQDDVDGTNNDK	14	-	-	760.3	763.322	1092.444	648.295	977.417
			Is	EGLQDDVDGTNNDK	14	14	K	764.3	771.336	1100.458	656.309	985.431
Slc21a11	Oatp3a1	NP_803434	St	SGELQGDEAQR	11	-	-	595.3	675.306	803.364	503.257	916.448
			Is	SGELQGDEAQR	11	9	A	597.3	679.313	807.371	507.264	920.456
Slc21a14	Oatp1c1	NP_445893	St	DFLPSLK	7	-	-	410.2	557.366	444.282	263.103	376.187
			Is	DFLPSLK	7	7	K	414.2	565.380	452.296	263.103	376.187
Slc22a1	Oct1	NP_036829	St	ENTIYLVQVTGK	12	-	-	697.4	936.515	773.452	660.368	345.141
			Is	ENTIYLVQVTGK	12	8	V	700.4	942.529	779.466	666.382	345.141
Slc22a2	Oct2	Q9R0W2	St	LNPSFLDLVR	10	-	-	587.3	946.536	849.483	762.451	387.272
			Is	LNPSFLDLVR	10	8	L	590.8	953.553	856.500	769.468	394.289
Slc22a3	Oct3	NP_062103	St	FLQGVFGK	8	-	-	448.2	635.351	507.293	351.203	748.435
			Is	FLQGVFGK	8	6	F	453.2	645.379	517.320	361.230	758.463
Slc22a6	Oat1	NP_058920	St	TSLAVLGK	8	-	-	394.7	600.408	487.324	317.219	416.287



			Is	TSLAVLGK	8	7	L	398.2	607.425	494.341	324.236	423.304
Slc22a7	Oat2	NP_445989	St	NLVLLALPR	9	-	-	504.8	781.530	682.461	569.377	456.293
			Is	NLVLLALPR	9	7	L	508.3	788.547	689.478	576.394	463.310
Slc22a8	Oat3	NP_112622	St	YGLSDLFR	8	-	-	485.8	807.436	750.415	637.330	550.298
			Is	YGLSDLFR	8	6	L	489.3	814.453	757.432	644.348	557.316
Slc22a12	Urat1	NP_001030115	St	NLPLPDTIQDIQK	13	-	-	747.9	1170.637	1057.553	960.500	503.283
			Is	NLPLPDTIQDIQK	13	8	I	751.4	1177.654	1064.570	967.517	510.300
Slc29a4	Pmat	NP_001099381	St	LLLPDER	7	-	-	428.3	516.241	742.410	629.325	419.189
			Is	LLLPDER	7	4	P	431.3	522.255	748.423	635.339	419.189
Slc38a1	Ata1	NP_620187	St	NELPSAIK	8	-	-	436.3	515.319	628.403	418.266	331.234
			Is	NELPSAIK	8	7	I	439.8	522.336	635.420	425.283	338.251
Slc38a2	Ata2	NP_851604	St	AYGLAGK	7	-	-	340.2	608.340	445.277	275.172	204.134
			Is	AYGLAGK	7	5	A	342.2	612.348	449.284	279.179	204.134
Slc38a4	Ata3	NP_570104	St	TSVITLLFPR	10	-	-	573.9	859.540	746.456	532.324	419.240
			Is	TSVITLLFPR	10	9	P	576.9	865.554	752.470	538.338	425.254
Slc47a1	Mate1	NP_001014140	St	HVGVILQR	8	-	-	461.3	784.504	685.436	529.346	416.262
			Is	HVGVILQR	8	6	L	464.8	791.521	692.453	536.363	423.279
	Oatp6b1	NP_596903	St	VFPYQIR	7	-	-	461.8	676.378	579.325	416.262	247.144
			Is	VFPYQIR	7	7	R	466.8	686.386	589.333	426.270	247.144
<b>Marker protein</b>												
Slc4a2	Ae2	NP_058744	St	FEEILQEAGSR	11	-	-	639.8	277.118	406.161	519.252	760.388
			Is	FEEILQEAGSR	11	11	R	644.8	277.118	406.161	529.252	760.388
		NP_036636										
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase (α1, α2, α3 subunits)	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase (α1, α2, α3 subunits)	(α1 subunit) NP_036637	St	AAVPDAVGK	9	-	-	414.2	685.388	586.320	489.267	374.240
		(α2 subunit) NP_036638										
		(α3 subunit)	Is	AAVPDAVGK	9	7	V	417.2	691.402	592.333	495.281	380.254

The SRM/MRM transitions for peptides were set up as described in the materials and methods section. Four SRM/MRM transitions (Q1/TOF-1, Q1/TOF-2, Q1/TOF-3, and Q1/TOF-4) were set for each peptide, and consisted of the m/z value of precursor ion (Q1) and the m/z range of  $m/z \pm 0.025$  for the four product ions (TOF-1, TOF-2, TOF-3, and TOF-4). The m/z values of Q1 were used to measure the target peptides in the MRM-HS mode of TripleTOF5600. The four transitions were used to extract the data of the target peptides from the raw data obtained in the MRM-HS analysis and quantify them in the MultiQuant software (AB SCIEX). <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N were used for amino acid labeling in the internal standard peptides (stable-isotope-labeled peptides). AA, amino acid; St, standard; Is, internal standard.

TableS2-2 Peptide Probes and SRM/MRM transitions for human molecules.

Gene Symbol	Alias	Genbank Accession Number	St or Is	Probe Sequence	Number of AA	Position of stable isotope-labeled AA from N-terminal	Stable isotope-labeled AA	SRM/MRM transition				
								Q1 (m/z)	TOF range (m/z ± 0.025)			
									1	2	3	4
ABC family												
ABCA1	ABC1	NP_005493	St	FVSPLSWDLVGR	12	-	-	688.4	1129.600	1042.568	832.431	945.515
			Is	FVSPLSWDLVGR	12	9	L	691.9	1136.617	1049.585	839.448	952.533
ABCA2	ABC2	NP_001597	St	LGGNPLFR	8	-	-	437.2	532.324	760.410	703.389	646.367
			Is	LGGNPLFR	8	6	L	440.7	539.342	767.427	710.406	653.384
ABCA3	ABC3	NP_001080	St	VPLLAVDR	8	-	-	441.8	573.336	686.420	460.251	783.472
			Is	VPLLAVDR	8	6	V	444.8	579.349	692.433	466.265	789.486
ABCA4	ABCR	NP_000341	St	VLPTLLDSR	9	-	-	507.3	801.447	603.346	704.394	914.531
			Is	VLPTLLDSR	9	6	L	510.8	808.464	610.363	711.411	921.548
ABCA5	ABCA5	NP_061142	St	NAVVPK	7	-	-	370.7	357.250	555.387	456.318	626.424
			Is	NAVVPK	7	6	I	374.2	364.267	562.404	463.335	633.441
ABCA6	ABCA6	NP_525023	St	TNTFPDLFSDLDK	13	-	-	756.9	1049.515	577.283	724.351	1196.583
			Is	TNTFPDLFSDLDK	13	11	L	760.4	1056.532	584.300	731.368	1203.601
ABCA7	ABCA7	NP_061985	St	QFQSPLR	7	-	-	438.2	385.256	600.347	472.288	747.415
			Is	QFQSPLR	7	6	L	441.7	392.273	607.364	479.305	754.432
ABCA8	ABCA8	NP_009099	St	LFPQAAR	7	-	-	401.7	542.305	445.252	317.193	689.373
			Is	LFPQAAR	7	6	A	403.7	546.312	449.259	321.200	693.380
ABCA9	ABCA9	NP_525022	St	LFPQAAQQR	10	-	-	594.3	927.500	830.400	702.400	631.300
			Is	LFPQAAQQR	10	6	A	596.3	931.500	834.400	706.400	635.300
ABCA10	ABC10	NP_525021	St	DGHGDSPLFFLK	12	-	-	666.8	569.195	779.332	1023.551	666.248
			Is	DGHGDSPLFFLK	12	11	L	670.3	569.195	779.332	1030.568	666.248
ABCA12	ABC12	NP_775099, isoform a NP_056472, isoform b	St	LLAIPIDNR	10	-	-	561.3	711.379	501.242	824.463	614.326
			Is	LLAIPIDNR	10	7	P	564.3	717.392	507.255	830.476	620.340
ABCA13	ABC13	NP_689914	St	FHPQNLPADGFK	12	-	-	685.8	1086.558	634.320	861.447	747.404
			Is	FHPQNLPADGFK	12	11	F	690.8	1096.585	644.347	871.474	757.431
ABCB1	MDR1	NP_000918	St	FYDPLAGK	8	-	-	455.7	763.400	600.300	485.300	275.200
			Is	FYDPLAGK	8	6	A	457.7	767.400	604.300	489.300	279.200
ABCB4	MDR3	NP_000434, isoform a NP_061337, isoform b NP_061338, isoform c	St	IATEAIENIR	10	-	-	565.3	531.289	715.410	644.373	844.452
			Is	IATEAIENIR	10	5	A	567.3	531.289	719.417	644.373	848.460
ABCB5	ABCB5	NP_848654	St	SADLIVTLK	9	-	-	480.3	686.481	801.508	573.397	460.313
			Is	SADLIVTLK	9	8	L	483.8	693.499	808.525	580.414	467.330
ABCB11	BSEP	NP_003733	St	STALQLIQR	9	-	-	515.3	529.346	657.404	841.526	770.489
			Is	STALQLIQR	9	6	L	518.8	536.363	664.422	848.543	777.506
ABCC1	MRP1	NP_004987	St	TPSGNLVNR	9	-	-	479.3	759.411	672.379	501.314	615.357
			Is	TPSGNLVNR	9	6	L	482.8	766.428	679.396	508.332	622.375
ABCC2	MRP2	NP_000383	St	QLLNNILR	8	-	-	492.3	742.457	629.373	515.330	401.287
			Is	QLLNNILR	8	7	L	495.8	749.474	636.390	522.347	408.304
ABCC3	MRP3	NP_003777	St	AEGEISDPFR	10	-	-	560.8	621.299	734.383	920.447	534.267
			Is	AEGEISDPFR	10	9	F	565.8	631.326	744.410	930.475	544.294

ABCC4	MRP4	NP_005836	St	APVLFFDR	8	-	-	482.8	584.283	697.367	796.435	893.488
			Is	APVLFFDR	8	4	L	486.3	584.283	704.384	803.452	900.505
ABCC5	MRP5	NP_005679	St	SLSEASVAVDR	11	-	-	567.3	646.352	717.389	933.464	559.320
			Is	SLSEASVAVDR	11	2	L	570.8	646.352	717.389	933.464	559.320
ABCC6	MRP6	NP_001162	St	APETEPFLR	9	-	-	530.3	532.324	762.415	891.457	661.367
			Is	APETEPFLR	9	8	L	533.8	539.342	769.432	898.474	668.384
ABCC7	CFTR	NP_000483	St	GLPLVHTLITVSK	13	-	-	689.4	898.536	761.477	997.604	660.429
			Is	GLPLVHTLITVSK	13	11	V	692.4	904.550	767.491	1003.618	666.443
ABCC8, C9	SUR1, 2	NP_000343 (SUR1) NP_005682, (SUR2)	St	TVVTIAHR	8	-	-	551.8	696.415	597.347	496.299	795.484
			Is	TVVTIAHR	8	6	A	555.3	700.422	601.354	500.306	799.491
ABCC10	MRP7	NP_258261	St	VFTALALVR	9	-	-	495.3	743.478	571.393	458.309	642.430
			Is	VFTALALVR	9	7	L	498.8	750.495	578.410	465.326	649.447
ABCC11	MRP8	NP_149163	St	FNLDPFDR	8	-	-	512.2	534.267	762.378	649.294	437.214
			Is	FNLDPFDR	8	6	F	517.2	544.294	772.405	659.321	447.242
ABCC12	MRP9	NP_150229	St	FSIAILPFSIK	11	-	-	618.4	591.350	888.556	704.434	817.518
			Is	FSIAILPFSIK	11	8	F	623.4	601.377	898.583	714.462	827.546
ABCC13	ABCC13	Q9NSE7	St	EDLFELK	7	-	-	447.2	536.308	649.392	764.419	893.462
			Is	EDLFELK	7	6	L	450.7	543.325	656.409	771.436	900.479
ABCG1	White	NP_058198	St	GAVLINGLPR	10	-	-	505.3	556.320	669.404	782.489	442.277
			Is	GAVLINGLPR	10	8	L	508.8	563.338	676.422	789.506	449.295
ABCG2	BCRP	NP_004818	St	SSLLDVLAAR	10	-	-	522.8	644.373	757.457	529.346	430.277
			Is	SSLLDVLAAR	10	7	L	526.3	651.390	764.474	536.363	437.295
ABCG4	White2	NP_071452	St	GVVTNLIPYLK	11	-	-	608.9	520.313	633.397	961.572	746.481
			Is	GVVTNLIPYLK	11	10	L	612.4	527.330	640.414	968.589	753.499
ABCG5	ABCG5	NP_071881	St	DSPGVFSK	8	-	-	418.7	634.356	537.303	480.282	721.388
			Is	DSPGVFSK	8	6	F	423.7	644.383	547.330	490.309	731.415
ABCG8	ABCG8	NP_071882	St	ASLLDVITGR	10	-	-	522.8	660.368	545.341	446.272	773.452
			Is	ASLLDVITGR	10	4	L	526.3	660.368	545.341	446.272	780.469
SLC family												
SLC1A3	EAAT1	NP_004163	St	VTAADAFDLIR	12	-	-	652.9	962.531	776.467	629.398	847.504
			Is	VTAADAFDLIR	12	11	I	656.4	969.548	783.484	636.415	854.521
SLC1A4	ASCT1	NP_003029	St	TYATDYK	7	-	-	431.2	760.400	597.300	526.300	310.200
			Is	TYATDYK	7	3	A	433.2	764.400	601.300	526.300	310.200
SLC1A5	ASCT2	NP_005619	St	STEPELIQVK	10	-	-	572.3	826.504	955.546	600.408	729.451
			Is	STEPELIQVK	10	7	I	575.8	833.521	962.563	607.425	736.468
SLC2A1	GLUT1	NP_006507	St	TFDEIASGFR	10	-	-	571.7	537.278	894.432	779.405	650.362
			Is	TFDEIASGFR	10	6	A	573.7	541.285	898.439	783.412	654.369
SLC2A2	GLUT2	NP_001265587	St	FLGATETV	8	-	-	837.4	318.182	261.160	619.309	720.357
			Is	FLGATETV	8	4	A	841.4	318.182	261.160	623.316	724.364
SLC2A3,14	GLUT3,14	NP_008862, GLUT3 NP_703150, GLUT14	St	QVTVLELFR	9	-	-	552.8	677.398	877.514	564.314	776.467
			Is	QVTVLELFR	9	8	F	557.8	687.425	887.542	574.341	786.494
SLC2A4	GLUT4	NP_001033	St	TFDQISAAFHR	11	-	-	646.8	688.353	801.437	601.321	929.495
			Is	TFDQISAAFHR	11	9	F	651.8	698.380	811.464	611.348	939.522
SLC2A5	GLUT5	NP_003030	St	AAGFISVLK	9	-	-	453.3	763.471	559.382	834.509	706.450
			Is	AAGFISVLK	9	9	K	457.3	771.486	567.396	842.523	714.464
SLC3A2	4F2hc	NP_002385	St	ADLLLSTQPGR	11	-	-	585.8	645.332	871.500	758.416	558.300
			Is	ADLLLSTQPGR	11	9	P	588.8	651.345	877.514	764.430	564.313

SLC6A2	NET	NP_001034	St	FTPAAEFYER	10	-	-	615.8	982.463	885.410	814.373	614.293
			Is	FTPAAEFYER	10	7	F	620.8	992.490	895.437	824.400	624.321
SLC6A4	SERT	NP_001036	St	LIITPGTFK	9	-	-	495.3	763.435	549.303	650.351	452.251
			Is	LIITPGTFK	9	8	F	500.3	773.462	559.331	660.378	462.278
SLC6A6	TAUT	NP_003034	St	FYLYPDITR	9	-	-	594.3	601.331	877.478	764.394	504.278
			Is	FYLYPDITR	9	7	I	597.8	608.348	884.495	771.411	511.295
SLC6A8	CRT1	NP_005620	St	GDGPVGLGTPGGR	13	-	-	570.3	714.390	544.284	657.368	813.458
			Is	GDGPVGLGTPGGR	13	10	P	573.3	720.403	550.298	663.382	819.472
SLC6A12	BGT1	NP_003035	St	NFGPSPTR	8	-	-	438.2	614.326	557.304	373.220	460.252
			Is	NFGPSPTR	8	6	P	441.2	620.340	563.318	379.233	466.265
SLC6A13	GAT2	NP_057699	St	ISDGIQHLGALR	12	-	-	640.4	666.405	416.262	794.463	529.346
			Is	ISDGIQHLGALR	12	11	L	643.9	673.422	423.279	801.481	536.363
SLC7A1	CAT1	NP_003036	St	FLANVNDR	8	-	-	474.8	617.300	688.337	503.257	801.421
			Is	FLANVNDR	8	5	V	477.8	623.314	694.351	509.271	807.435
SLC7A5	LAT1	NP_003477	St	VQDAFAAAK	9	-	-	460.7	693.357	360.224	578.330	821.415
			Is	VQDAFAAAK	9	7	A	462.7	697.364	364.231	582.337	825.422
SLC7A8	LAT2	NP_036376	St	DVAGQPQP	8	-	-	811.4	341.182	696.368	597.299	526.262
			Is	DVAGQPQP	8	6	P	817.4	347.196	702.382	603.313	532.276
SLC7A11	xCT	NP_055146	St	GGYLQGNVNGR	11	-	-	567.8	744.375	616.316	559.295	346.183
			Is	GGYLQGNVNGR	11	8	V	570.8	750.389	622.330	565.309	346.183
SLC10A1	NTCP	NP_003040	St	GIYDGDLK	8	-	-	440.7	710.336	260.197	547.272	432.245
			Is	GIYDGDLK	8	7	L	444.2	717.353	267.214	554.290	439.263
SLC10A2	ASBT	NP_000443	St	IAGLPWYR	8	-	-	488.3	621.314	242.150	791.420	862.457
			Is	IAGLPWYR	8	5	P	491.3	627.328	242.150	797.434	868.471
SLC10A3	P3	NP_062822	St	VELEVLK	7	-	-	415.3	601.392	229.119	730.435	342.203
			Is	VELEVLK	7	5	V	418.8	608.409	229.119	737.452	342.203
SLC10A4	P4	NP_689892	St	VADYIVK	7	-	-	404.2	171.113	637.356	708.393	246.181
			Is	VADYIVK	7	6	V	407.2	171.113	643.369	714.407	252.195
SLC15A1	PEPT1	NP_005064	St	TLPVFFK	7	-	-	401.2	587.355	244.166	215.139	391.234
			Is	TLPVFFK	7	6	P	404.2	593.369	250.180	215.139	397.248
SLC15A2	PEPT2	NP_066568	St	WTLQAIR	7	-	-	444.3	701.431	600.383	487.299	359.240
			Is	WTLQAIR	7	6	I	447.8	708.448	607.400	494.316	366.257
SLC15A3	PHT2	NP_057666	St	LIDPLLLR	8	-	-	476.8	726.451	611.424	227.176	342.203
			Is	LIDPLLLR	8	7	L	480.3	733.468	618.441	227.176	342.203
SLC16A1	MCT1	NP_003042	St	SITVFFK	7	-	-	421.2	641.366	294.181	441.250	540.318
			Is	SITVFFK	7	6	F	426.2	651.393	304.209	451.277	550.345
SLC16A3	MCT4	NP_004198	St	LLDLSVFR	8	-	-	481.8	849.483	736.399	621.372	508.288
			Is	LLDLSVFR	8	7	F	486.8	859.510	746.426	631.399	518.315
SLC16A4	MCT5	NP_004687	St	QLFDISLFR	9	-	-	569.8	522.304	897.483	635.388	750.415
			Is	QLFDISLFR	9	8	F	574.8	532.331	907.510	645.415	760.442
SLC16A7	MCT2	NP_004722	St	AVTVFFK	7	-	-	406.2	641.366	441.250	294.181	540.318
			Is	AVTVFFK	7	6	F	411.2	651.393	451.277	304.209	550.345
SLC16A8	MCT3	NP_037488	St	AVSVFFR	7	-	-	413.2	655.356	469.256	568.324	754.425
			Is	AVSVFFR	7	6	F	418.2	665.383	479.283	578.351	764.452
SLC16A2	MCT8	NP_006508	St	VHEPEPTPTVETR	13	-	-	497.9	366.177	702.378	592.273	504.278
			Is	VHEPEPTPTVETR	13	8	P	501.3	366.177	710.378	592.273	512.278
SLC16A10	MCT10	NP_061063	St	VLIDSVGLFYTLR	13	-	-	748.4	869.488	213.160	1170.615	699.383
			Is	VLIDSVGLFYTLR	13	12	L	751.9	876.505	213.160	1177.633	706.400
SLC19A1	RFC1	NP_919231	St	QPPAQGLR	8	-	-	433.7	641.373	345.225	473.283	544.320
			Is	QPPAQGLR	8	7	L	437.2	648.390	352.242	480.300	551.338
SLC21A2	PGT	NP_005621	St	VNTAAVNLPVGDPR	14	-	-	711.9	541.273	640.341	867.468	966.537

SLC21A3	OATP1A2	NP_066580	Is	VNTAAVNLPVGDPR	14	13	P	714.9	547.287	646.355	873.482	972.551
			St	EGLETNADIHK	11	-	-	601.8	774.436	673.388	559.345	903.478
SLC21A6	OATP1B1	NP_006437	Is	EGLETNADIHK	11	10	I	605.3	781.453	680.405	566.362	910.496
			St	LNTVGIK	8	-	-	408.3	588.400	388.300	487.300	702.400
SLC21A8	OATP1B3	NP_062818	Is	LNTVGIK	8	6	I	411.8	595.400	395.300	494.300	709.400
			St	IYNSVFFGR	9	-	-	551.8	526.277	826.421	712.378	989.484
SLC21A9	OATP2B1	NP_009187	Is	IYNSVFFGR	9	7	F	556.8	536.305	836.448	722.405	999.511
			St	VLLQTLR	7	-	-	421.8	630.394	517.309	389.251	743.478
SLC21A11	OATP3A1	NP_037404	Is	VLLQTLR	7	6	L	425.3	637.411	524.327	396.268	750.495
			St	SGELQGDEAQR	11	-	-	595.3	675.306	803.364	503.257	916.448
SLC21A12	OATP4A1	NP_057438	Is	SGELQGDEAQR	11	9	A	597.3	679.313	807.371	507.264	920.456
			St	YEVELDAGVR	10	-	-	575.8	517.273	759.400	402.246	858.468
SLC21A14	OATP1C1	NP_059131	Is	YEVELDAGVR	10	9	V	578.8	523.287	765.413	408.260	864.482
			St	LYDSNVFR	8	-	-	507.3	737.358	622.331	900.421	535.299
SLC21A15	OATP5A1	NP_112220	Is	LYDSNVFR	8	7	F	512.3	747.385	632.358	910.448	545.326
			St	NPVHLDQNDPR	11	-	-	652.8	272.172	994.470	857.411	744.327
SLC21A19	OATP6A1	NP_001275933	Is	NPVHLDQNDPR	11	10	P	655.8	278.186	1000.484	863.425	750.341
			St	IFGTIPGPSIFK	12	-	-	638.9	745.425	1016.578	858.509	648.372
SLC21A20	OATP4C1	NP_851322	Is	IFGTIPGPSIFK	12	10	I	642.4	752.442	1023.595	865.526	655.389
			St	DFPAALK	7	-	-	381.2	499.324	235.108	263.103	381.213
SLC22A1	OCT1	NP_003048	Is	DFPAALK	7	7	K	385.2	507.338	235.108	263.103	385.221
			St	LSPSFADLFR	10	-	-	576.8	476.748	768.404	855.436	621.336
SLC22A2	OCT2	NP_003049	Is	LSPSFADLFR	10	8	L	580.3	480.257	775.421	862.453	628.353
			St	SLPASLQR	8	-	-	436.2	336.196	671.384	503.294	574.331
SLC22A3	OCT3	NP_068812	Is	SLPASLQR	8	6	L	439.7	339.704	678.401	510.311	581.348
			St	FLQGVFGK	8	-	-	448.2	635.351	507.293	351.203	748.435
SLC22A4	OCTN1	NP_003050	Is	FLQGVFGK	8	6	F	453.2	645.379	517.320	361.230	758.463
			St	AFILD LFR	8	-	-	497.8	663.383	550.298	776.467	435.272
SLC22A5	OCTN2	NP_003051	Is	AFILD LFR	8	6	L	501.3	670.400	557.316	783.484	442.289
			St	TWNIR	5	-	-	345.2	402.246	260.140	288.203	588.325
SLC22A6	OAT1	NP_004781	Is	TWNIR	5	4	I	348.7	409.263	260.140	295.220	595.343
			St	TSLAVLGK	8	-	-	394.7	600.408	487.324	317.219	416.287
SLC22A7	OAT2	NP_006663	Is	TSLAVLGK	8	6	L	398.2	607.425	494.341	324.236	423.304
			St	NVALLALPR	9	-	-	483.8	753.498	569.377	456.293	682.461
SLC22A8	OAT3	NP_004245	Is	NVALLALPR	9	7	L	487.3	760.516	576.394	463.310	689.478
			St	YTASDLFR	8	-	-	486.7	708.368	435.272	637.330	809.415
SLC22A9	UST3	NP_543142	Is	YTASDLFR	8	6	L	490.2	715.385	442.289	644.348	816.432
			St	VEVTQF	6	-	-	722.4	494.261	395.193	294.145	557.293
SLC22A10	OAT5	NP_001034841	Is	VEVTQF	6	3	V	728.4	500.275	395.193	294.145	563.307
			St	NLPLPDTIK	9	-	-	505.8	783.461	573.324	686.409	476.272
SLC22A11	OAT4	NP_060954	Is	NLPLPDTIK	9	8	I	509.3	790.479	580.342	693.426	483.289
			St	VVFAVLGK	8	-	-	416.8	634.392	487.324	416.287	733.461
SLC22A12	URAT1	NP_653186	Is	VVFAVLGK	8	6	L	420.3	641.410	494.341	423.304	740.478
			St	GGAILGPLVR	10	-	-	476.8	541.346	654.430	484.324	767.514
SLC22A13	OCTL1	NP_004247	Is	GGAILGPLVR	10	8	L	480.3	548.363	661.447	491.342	774.531
			St	TGPGSNALDLFR	12	-	-	624.3	734.420	992.516	905.484	848.463
SLC22A14	OCTL2	NP_004794	Is	TGPGSNALDLFR	12	10	L	627.8	741.437	999.533	912.501	855.480
			St	DQPLSESLNHSSQIR	15	-	-	570.9	590.326	727.385	503.294	841.428
SLC22A15	FLIPT1	NP_060890	Is	DQPLSESLNHSSQIR	15	14	I	573.2	597.343	734.402	510.311	848.445
			St	VGGIAPFIPSLK	13	-	-	656.4	444.282	801.487	872.524	985.608
			Is	VGGIAPFIPSLK	13	12	L	659.9	451.299	808.504	879.541	992.626

SLC22A17	BOCT	NP_065105	St	QPPPTR	6	-	-	348.2	470.272	373.220	276.167	323.172
			Is	QPPPTR	6	4	P	351.2	476.286	379.233	276.167	323.172
SLC22A18	SLC22A18	NP_899056	St	TLGPTVGGLLYR	12	-	-	623.9	678.394	1032.584	777.462	878.510
			Is	TLGPTVGGLLYR	12	10	L	627.4	685.411	1039.601	784.479	885.527
SLC27A1	FATP1	NP_940982	St	LLPQVDTTGTFK	12	-	-	660.4	1093.553	227.176	868.441	769.373
			Is	LLPQVDTTGTFK	12	11	F	665.4	1103.580	227.176	878.468	779.400
SLC27A2	FATP2	NP_003636	St	DALYFLDDTAK	11	-	-	636.3	809.404	300.156	972.467	187.072
			Is	DALYFLDDTAK	11	10	A	638.3	813.411	300.156	976.474	187.072
SLC27A3	FATP3	NP_077306	St	YSALLAGNLR	10	-	-	539.3	530.305	643.389	459.268	827.510
			Is	YSALLAGNLR	10	9	L	542.8	537.322	650.406	466.285	834.527
SLC28A1	CNT1	NP_004204	St	AGSSFVFGALVK	13	-	-	656.4	763.435	616.367	862.503	559.345
			Is	AGSSFVFGALVK	13	11	L	659.9	770.452	623.384	869.521	566.362
SLC28A2	CNT2	NP_004203	St	LAYPEVEESK	10	-	-	582.8	817.394	980.457	720.341	591.299
			Is	LAYPEVEESK	10	6	V	585.8	823.408	986.471	726.355	597.312
SLC28A3	CNT3	NP_071410	St	DHFFAFK	7	-	-	304.5	400.162	400.162	547.230	659.355
			Is	DHFFAFK	7	6	F	307.8	400.162	400.162	547.230	669.382
SLC29A1	ENT1	NP_001071643	St	WLPSLVLAR	9	-	-	527.8	755.478	658.425	571.393	458.309
			Is	WLPSLVLAR	9	7	L	531.3	762.495	665.442	578.410	465.326
SLC29A2	ENT2	NP_001523	St	SLTSYFLWPDEDSR	14	-	-	858.4	718.300	904.380	1164.532	1017.464
			Is	SLTSYFLWPDEDSR	14	9	P	861.4	724.314	910.393	1170.546	1023.477
SLC29A4	PMAT	NP_694979	St	LLLPDER	7	-	-	428.3	516.241	742.410	629.325	419.189
			Is	LLLPDER	7	4	P	431.3	522.255	748.423	635.339	419.189
SLC38A1	ATA1	NP_109599	St	NELPSAIK	8	-	-	436.3	515.319	628.403	418.266	331.234
			Is	NELPSAIK	8	7	I	439.8	522.336	635.420	425.283	338.251
SLC38A2	ATA2	NP_061849	St	AFGLVGK	7	-	-	346.2	473.308	303.203	620.377	416.287
			Is	AFGLVGK	7	4	L	349.7	480.326	303.203	627.394	423.304
SLC38A4	ATA3	NP_060488	St	YELPEVIR	8	-	-	509.8	613.367	726.451	855.494	516.314
			Is	YELPEVIR	8	7	I	513.3	620.384	733.468	862.511	523.331
SLC44A1	CTL1	NP_536856	St	GSFIITLVK	9	-	-	489.3	573.397	686.481	405.214	833.550
			Is	GSFIITLVK	9	8	V	492.3	579.411	692.495	405.214	839.564
SLC44A2	CTL2	NP_065161	St	VTDFLFLLGK	10	-	-	576.8	201.124	952.550	1053.598	204.134
			Is	VTDFLFLLGK	10	8	L	580.3	201.124	959.568	1060.615	204.134
SLC46A1	PCFT	NP_542400	St	SIVQLYVAPAPEK	13	-	-	707.9	541.298	874.467	612.335	711.404
			Is	SIVQLYVAPAPEK	13	11	P	710.9	547.312	880.481	618.349	717.418
SLC47A1	MATE1	NP_060712	St	GGPEATLEVR	10	-	-	514.8	457.751	617.362	688.399	817.442
			IS	GGPEATLEVR	10	9	V	517.8	460.758	623.376	694.413	823.455
SLC47A2	MATE2-k	NP_001093116	St	YLQNQK	6	-	-	397.2	630.400	517.300	389.200	275.200
			IS	YLQNQK	6	2	L	400.7	637.400	517.300	389.200	275.200
<b>Marker protein</b>												
Occuldin	Occuldin	NP_002529	St	WTSPPGVIR	9	-	-	506.8	725.431	638.399	541.346	826.478
			Is	WTSPPGVIR	9	8	I	510.3	732.448	645.416	548.363	833.496
VE-cadherin	VE-cadherin	NP_001786	St	YTFVVPEDTR	10	-	-	613.8	617.289	716.357	962.494	815.426
			Is	YTFVVPEDTR	10	6	P	616.8	623.303	722.371	968.508	821.440
Claudin-11	Claudin-11	NP_005593	St	FYYTAGSSSPTHAK	14	-	-	758.9	871.427	942.464	1043.512	1206.575
			Is	FYYTAGSSSPTHAK	14	5	A	760.9	875.434	946.471	1047.519	1210.582
Claudin-3	Claudin-3	NP_001297	St	VVYSAPR	7	-	-	396.2	593.304	430.241	343.209	692.373
			Is	VVYSAPR	7	6	P	399.2	599.318	436.255	349.223	698.386
JAM-A	JAM-A	NP_058642	St	VTFLPTGITFK	11	-	-	612.4	763.435	876.519	666.382	565.335
			Is	VTFLPTGITFK	11	10	F	617.4	773.462	886.546	676.410	575.362
SLC4A2	AE2	NP_003031	St	FEEILQEAGSR	11	-	-	639.8	277.118	406.161	519.252	760.388
			Is	FEEILQEAGSR	11	11	R	644.8	277.118	406.161	529.252	760.388

Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase (α1, α2, α3 subunits)	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase (α1, α2, α3 subunits)	NP_036636, (α1 subunit) NP_036637, (α2 subunit) NP_036638, (α3 subunit)	St	AAVPDAVGK	9	-	-	414.2	685.388	586.320	489.267	374.240
			Is	AAVPDAVGK	9	7	V	417.2	691.402	592.333	495.281	380.254

The SRM/MRM transitions for peptides were set up as described in the Materials and Methods section. Four SRM/MRM transitions (Q1/TOF-1, Q1/TOF-2, Q1/TOF-3, and Q1/TOF-4) were set for each peptide, and consisted of the m/z value of precursor ion (Q1) and the m/z range of  $m/z \pm 0.025$  for the four product ions (TOF-1, TOF-2, TOF-3, and TOF-4). The m/z values of Q1 were used to measure the target peptides in the MRM-HS mode of the TripleTOF5600. The four transitions were used in the MultiQuant software (AB SCIEX) to extract the data of the target peptides from the raw data obtained in the MRM-HS analysis and to quantify them. <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N were used for amino acid labeling in the internal standard peptides (stable-isotope-labeled peptides). AA, amino acid; St, standard; Is, internal standard.

### 第3節 ラット軟髄膜における輸送担体タンパク質発現量解析及び *in vivo* 機能解析

#### Isolation of the leptomeninges from rat

Animals were decapitated under anesthesia induced with isoflurane, and the leptomeninges were freshly isolated from Wistar rat brains (about 289 mg of wet tissue pooled from 12 males) as reported (Bowyer et al., 2012). Briefly, as the connection between the dura mater and the arachnoid membrane is loose (Kolias et al., 2014), the dura mater is generally removed with the skull during brain extraction. The isolated brain was chilled in ice-cold normal saline for 5 min, then turned upside down, and the middle cerebral arteries (MCA) and the anterior artery were gripped with small bent-tip forceps and pulled gently in an anterior-dorsal direction to lift the leptomeninges covering the ventral anterior cortex. Then, the brain was turned to a 45° to 90° angle to the Petri dish. The lateral, more anterior regions of the leptomeninges surrounding the lateral cortical regions were freed from the cortex by gripping the MCA and associated arteries and gently pulling dorsally along the cortex. To remove the most dorsal regions of the leptomeninges surrounding the primary somatosensory and motor cortex, the brain was turned dorsal side up. Finally, the leptomeninges covering the cerebellum were also gently removed with the forceps.

#### Quantification of protein expression levels

Unlabeled (standard) and stable-isotope labeled peptides (internal standard) used to quantify targeted proteins were designed by employing the in-silico peptide selection criteria reported previously (Kamiie et al., 2008), and synthesized by Thermo Fisher Scientific (Sedanstrasse, Germany) with > 95% peptide purity. The concentrations of peptide solutions were determined by quantitative amino acid analysis using an HPLC-UV system with post-column ninhydrin derivatization (LaChrom Elite, Hitachi, Tokyo, Japan). Other chemicals were commercial products of analytical grade.

#### Preparation of plasma membrane fraction of rat leptomeninges and lysyl endopeptidase and trypsin digestion

Plasma membrane fraction was prepared as previously described (Uchida et al., 2015).



The recovery rate of plasma membrane fraction was 437 µg protein/g wet tissue of isolated leptomeninges. The plasma membrane fractions were stored at −80 °C. The plasma membrane fraction of isolated leptomeninges (50 µg protein) was subjected to LysC and trypsin digestion as described previously (Uchida et al., 2015).

### **Clean-up of peptide samples for LC–MS/MS analysis**

Samples of calibration curve and digested leptomeninges for trap & elute LC-MS/MS injection were cleaned up by using GL-tip GC and SDB (GL Science Inc., Tokyo, Japan), according to the manufacturer's protocol. Each injection for the calibration curve included 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, or 200 fmol of standard peptides, 50 fmol of internal standard peptides and tryptic digest equivalent to 1 µg protein of *E. coli* lysate, and each injection for the leptomeninges sample included 50 fmol of internal standard peptides and tryptic digest equivalent to 1 µg protein of plasma membrane fraction. Samples for direct LC-MS/MS injection were cleaned up by using GL-tip GC and SDB according to a modified protocol as follows. After connecting a centrifuge adaptor to a tube and inserting GC (down) and SDB (up) tips, 100% acetonitrile (ACN) was added, followed by centrifugation at 300 g for 5 min at 10 °C to condition the tip column. Next, 50% ACN/0.5% formic acid (FA)/water was added, followed by centrifugation at 3000 g for 5 min at 10 °C. Next, 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)/water was added, followed by centrifugation at 3000 g for 5 min at 10 °C for equilibration. The samples were added to the tips and centrifuged at 3000 g for 5 min at 10 °C for desalting. The sample tube was washed with 0.1% TFA/water and the washing was added to the tips, followed by centrifugation at 3000 g for 5 min at 10 °C. Next, 0.1% TFA/water was added, followed by centrifugation at 3000 g for 5 min at 10 °C twice. Then 0.5% FA/water was added, followed by centrifugation at 3000 g for 5 min at 10 °C twice for rinsing. After transfer to new tubes and top-to-bottom switching of the GC (up) and SDB (down) tips, 50% ACN/0.5% FA/water was added, followed by centrifugation at 3000 g for 5 min at 10 °C twice to elute the peptides. The resultant eluates were evaporated by centrifugation under vacuum for 1 h with a CC-105 centrifugal concentrator (low heat mode; TOMY, Tokyo, Japan), and the residues were reconstituted in 2% ACN/0.1% FA/water. Each injection for the calibration curve included 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100,

or 200 fmol of standard peptides, 60 fmol of internal standard peptides and tryptic digest equivalent to 2 µg protein of E. coli lysate, and each injection for the leptomeninges sample included 60 fmol of internal standard peptides and tryptic digest equivalent to 2 µg protein of plasma membrane fraction.

### **Parallel reaction monitoring (PRM) in NanoLC-TripleTOF5600 system**

Protein quantification of target molecules was performed with a NanoLC-Ultra 1Dplus system (Eksigent Technologies, Dublin, CA, USA) coupled with a cHiPLC-nanoflex system (Eksigent Technologies) and a TripleTOF5600 (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) equipped with a NanoSpray III ion source (AB SCIEX). Mobile phases A and B consisted of 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in acetonitrile, respectively. The cleaned-up peptide samples were loaded onto the trap column (200 µm x 6 mm, ReproSil-Pur 3µm, C18-AQ 120A°) (Eksigent Technologies) and separated on an analytical column (75 µm x 15 cm, ReproSil-Pur 3µm, C18-AQ 120A°) (Eksigent Technologies) with injection amounts corresponding to 1 µg of protein (trap & elute LC-MS/MS injection) or directly loaded onto a handmade analytical column [PicoFrit Self-Pack (New Objective) filled by ProntoSIL 200-3-C18 AQ, 3 µm (Bischoff Chromatography)] with injection amounts corresponding to 2 µg of protein (direct LC-MS/MS injection). The flow rate and linear gradient were the same as previously reported for the former procedure (Armania et al., 2016), while for the direct injection, the peptides were separated and eluted from the column at a flow rate of 300 nL/min with a linear gradient as follows: 2-40% B (0-120 min), increased to 100% B (120.1-130 min), maintained at 100% (130-135 min), then reduced to 2% B (135.1-150 min), and maintained at 2% B (150-180 min).

The PRM transitions for the quantification of each peptide were set as shown in Table S3-1. All of the target molecules were measured by LC-MS/MS three times (three injections/sample × one sample). Data analysis was performed as previously described (Uchida et al., 2015). The protein expression levels of each measurement were calculated as described by Uchida et al. (Uchida et al., 2015). The final values given in Table 1 were each calculated as the average of three measurements. The value of the limit of quantification (LQ, fmol/µg protein) was determined as described by Uchida et

al. (Uchida et al., 2015).

#### Distribution of rhodamine 123 after intracisternal administration

To examine the distribution of rhodamine 123 in the brain and spinal cord after intracisternal administration, rhodamine 123 (4.38 nmol) dissolved in 5  $\mu$ L of artificial CSF containing 5% DMSO was injected at the speed of 20  $\mu$ L/min via cisterna magna puncture. The initial concentration ( $C_0$ ) of rhodamine 123 was 17.5  $\mu$ M containing 0.1% DMSO, on the assumption that the volume of rat CSF is 250  $\mu$ L (20). Brain was isolated at 15 min after the intracisternal administration and frozen on dry ice. Sections (20  $\mu$ m in thickness) were prepared with a cryostat (Leica CM 1900; Leica Microsystems, Bensheim, Germany). Rhodamine 123 fluorescence in the tissues was detected with a fluorescence microscope (IX-FLA, Olympus, Tokyo, Japan).

#### Para-aminohippuric acid (PAH) uptake from the CSF after intracisternal administration in rats

##### Intracisternal administration of PAH and FITC-inulin

Rats were anesthetized by intramuscular injection of ketamine and xylazine (50 mg/kg body weight, respectively), and their heads were fixed in a stereotaxic apparatus (Narishige, Tokyo, Japan). To exclude any contribution of the choroid plexus to PAH uptake from the CSF, intercisternal administration was performed. PAH (357.5 pmol) was mixed with FITC-inulin (10  $\mu$ g) and dissolved in 5  $\mu$ L of artificial CSF (122 mM NaCl, 15 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mM glucose, 0.4 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3 mM KCl, 1.4 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM HEPES), then injected at the speed of 20  $\mu$ L/min via cisterna magna puncture. The  $C_0$  of PAH was 1.43  $\mu$ M, on the assumption that the volume of rat CSF is 250  $\mu$ L (Bass et al., 1973); this  $C_0$  was set as one-tenth of the  $K_m$  of PAH to rat oat1 (Sekine et al., 1997). For inhibition study, a mixture of PAH (357.5 pmol) and FITC-inulin (10  $\mu$ g) was injected with or without pre-administration of cephalothin or ceftriaxone. These inhibitors were dissolved in 5  $\mu$ L artificial CSF at the concentrations of 0.2 mM or 3 mM for cephalothin and 1.7 mM or 4.2 mM for ceftriaxone as  $C_0$  in the CSF, respectively. CSF samples (approximately 80~120  $\mu$ L) were withdrawn via cisterna magna puncture using a 1 mL syringe at the designated

time after administration.

The fluorescence of FITC-inulin in the CSF specimens was measured using a Fluoroskan Ascent FL (LabSystems, Helsinki, Finland). A CSF sample (10  $\mu$ L) was added to 90  $\mu$ L 0.5 M HEPES and the concentration of FITC-inulin was calculated from a standard curve (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10  $\mu$ g/mL in 0.5 M HEPES, 100  $\mu$ L/ per standard curve sample for fluorescence measurement). The excitation wavelength and the fluorescence wavelength were 485 nm and 538 nm, respectively. The scan time was 1000 msec.

#### Quantification of PAH by LC-MS/MS

In the present study, LC-MS/MS was used to quantify PAH. A 50  $\mu$ L aliquot of each collected CSF sample was mixed with 50  $\mu$ L 1% formic acid/acetonitrile containing internal standard (IS) (famotidine). For the standard curve, 50  $\mu$ L aliquots of various concentrations of PAH/artificial CSF (0, 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 50 pmol/injection, respectively) were mixed with 50  $\mu$ L 1% formic acid/acetonitrile contained IS (famotidine) for 10 min at room temperature, and then centrifuged at 15,000 rpm for 10 min at 4°C. The supernatants were centrifuged again under the same conditions, and the resultant supernatants were evaporated by centrifugation under vacuum for 1 h with a CC-105 centrifugal concentrator (low heat mode; TOMY, Tokyo, Japan). The residues were reconstituted in 0.1% formic acid/water and centrifuged at 15,000 rpm for 10 min at 4 °C. A 50  $\mu$ L aliquot of each sample was injected into the LC-MS/MS.

The concentration of PAH in CSF was calculated using the standard curve obtained with an electrospray ionization–triple quadrupole mass spectrometer (QTRAP5500; AB SCIEX, Framingham, MA) coupled to a UPLC system (Waters) equipped with a C18 column (ACQUITY UPLC BEHC18, 1.7  $\mu$ m 2.1  $\times$  50 mm, Waters). Mobile phases A and B consisted of 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in acetonitrile, respectively. The flow rate was 0.5 mL/min. The compounds were separated and eluted from the column with a linear gradient as follows: 1% B (0-1 min), rapidly increased to 100% B (1-3 min), maintained at 100% B (3-4 min), rapidly reduced to 0% B for 0.1 min (4-4.1 min), and then maintained at 1% B (4.1-6 min). The target compounds eluted from the UPLC column were simultaneously and selectively detected by means of

electrospray ionization in a multiplexed SRM/MRM mode. Multiple reaction monitoring transitions were  $m/z$  195.072→120.023 for PAH and  $m/z$  338.286→189.146 for famotidine. The declustering potentials were 76 V for PAH and 36 V for famotidine. The collision energy was 23 V. The source/gas parameters were as follows: ion source gas 1 (50 psi), ion source gas 2 (50 psi), curtain gas (10 psi), collision gas (7 psi), ion spray voltage (5500 V), interface heater temperature (400°C).

The uptake rates were calculated from the slope of the PAH concentration remaining in the CSF between 2 min and 15 min, as previously reported (Tachikawa et al., 2012).

#### Immunohistochemical stainings

Under deep anesthesia by intramuscular injection of ketamine and xylazine (50 mg/kg body weight, respectively), rats were transcardially perfused with phosphate-buffered saline (PBS). The brain and kidney tissues were isolated and frozen on dry ice. The frozen tissue sections (20  $\mu$ m in thickness) were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer for 30 minutes at room temperature. The sections were immersed with 0.2% Triton-X in PBS followed by blocking with 10% donkey serum for 30 min. They were immune-reacted overnight with rabbit anti-SLC22A6 (1  $\mu$ g/mL) (Abcam, Cambridge, MA) at 4 °C, then incubated with goat anti rabbit IgG Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibodies (Life Technologies Inc., Maryland) for 2 h. Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1  $\mu$ g/mL) for 10 min. Photographs were taken with a confocal laser scanning microscope Leica TCS SP8 (Leica, Japan).

#### Western blot analysis

The plasma membrane fractions of rat leptomeninges were dissolved in the sample buffer [10% 2-mercaptoethanol (Wako, Osaka, Japan), 4% sodium dodecyl sulfate (SDS) (Nacalai tesque, Kyoto, Japan), 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% sucrose (Wako), 0.004% bromophenol blue]. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis was performed on 10% polyacrylamide gel. The proteins were electrophoretically transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane and incubated with blocking buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 125 mM NaCl, 0.1% Tween20 and 4% skim milk).

The PVDF membrane was incubated with rabbit anti-OAT1 antibody (0.5 µg/mL; Abcam, Cambridge, MA) in the blocking buffer overnight at 4 °C and then probed with horseradish peroxidase-conjugated goat anti rabbit IgG secondary antibodies in the blocking buffer for 1 h at room temperature. The bands were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham, Arlington Heights, IL) with an ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

#### Statistical analysis

Unless otherwise indicated, all data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. An unpaired, two-tailed Student's t test was used to determine the significance of differences between two group means. One-way analysis of variance followed by the modified Fisher's least-squares difference method was used to assess the statistical significance of differences among means of more than two groups.

Table S3-1 Target peptide transitions in LC-MS/MS analysis

Gene Symbol	Alias	Genbank Accession Number	St or Is	Probe Sequence	Number of AA	Position of stable isotope-labeled AA from N-terminal	Stable isotope-labeled AA	SRM/MSM transition				
								Q1 (m/z)	TOF range (m/z ± 0.025)			
									1	2	3	4
ABC family												
Abca1	Abc1	NP_835196	St	FVSPLSWDLVGR	12	-	-	688.4	1129.600	1042.568	832.431	945.515
			Is	FVSPLSWDLVGR	12	9	L	691.9	1136.617	1049.585	839.448	952.532
Abca2	Abc2	NP_077372	St	LLFGPLPDLDGK	12	-	-	642.9	1058.552	911.483	757.409	432.245
			Is	LLFGPLPDLDGK	12	9	L	646.4	1065.569	918.500	764.426	439.262
Abca3	Abc3	XP_001054650	St	VFQVGNGK	7	-	-	396.2	692.373	545.304	318.177	417.246
			Is	VFQVGNGK	7	4	V	399.2	698.386	551.318	318.177	423.259
Abca4	Abc4	NP_001101191	St	WIAEPAR	7	-	-	421.7	656.373	543.289	343.209	175.119
			Is	WIAEPAR	7	6	A	423.7	660.380	547.296	347.216	175.119
Abca5	Abca5	NP_775429	St	NAVVPIK	7	-	-	370.7	357.250	555.387	456.318	626.424
			Is	NAVVPIK	7	6	I	374.2	364.267	562.404	463.335	633.441
Abca7	Abca7	NP_997481	St	QFQSPLR	7	-	-	438.2	385.256	600.346	472.288	747.415
			Is	QFQSPLR	7	6	L	441.7	392.273	607.364	479.305	754.432
Abca8a	Abca8a	NP_001268753	St	DLTLDVYK	8	-	-	483.8	738.403	637.356	524.272	310.176
			Is	DLTLDVYK	8	6	V	486.8	744.417	643.369	530.285	310.176
Abca9	Abca9	XP_017453218 (isoform X1) XP_017459655 (isoform X2)	St	ATFTNTER	8	-	-	470.2	767.368	620.300	519.252	384.188
			Is	ATFTNTER	8	8	R	475.2	777.377	630.308	529.260	389.192
Abca12	Abca12	XP_001054709	St	LLAIPIDNR	10	-	-	561.3	711.378	501.242	824.463	614.326
			Is	LLAIPIDNR	10	7	P	564.3	717.392	507.255	830.476	620.34
Abcb1a	Mdr1a	NP_596892	St	NTTGALTTR	9	-	-	467.8	618.357	719.405	490.298	561.336
			Is	NTTGALTTR	9	6	L	471.3	625.374	726.422	497.316	568.353
Abcb11	Bsep	NP_113948	St	STALQLIQR	9	-	-	515.3	529.346	657.404	841.525	770.488
			Is	STALQLIQR	9	6	L	518.8	536.363	664.421	848.543	777.506
Abcc1	Mrp1	NP_071617	St	TPSGNLVNR	9	-	-	479.3	759.411	672.379	501.314	615.357
			Is	TPSGNLVNR	9	6	L	482.8	766.428	679.396	508.332	622.374
Abcc4	Mrp4	NP_596902	St	APVLFFDR	8	-	-	482.8	584.283	697.367	796.435	893.488
			Is	APVLFFDR	8	4	L	486.3	584.283	704.384	803.452	900.505
Abcc5	Mrp5	NP_446376	St	SLSEASVAVDR	11	-	-	567.3	646.352	717.389	933.464	559.320
			Is	SLSEASVAVDR	11	2	L	570.8	646.352	717.389	933.464	559.320
Abcc6	Mrp6	NP_112275	St	SLLWDVAR	8	-	-	480.3	759.415	646.331	460.251	345.225
			Is	SLLWDVAR	8	3	L	483.8	766.432	646.331	460.251	345.225
Abcc10	Mrp7	NP_001101671	St	SEGAVALHVYR	11	-	-	601.3	985.558	928.536	857.499	758.431
			Is	SEGAVALHVYR	11	7	L	604.8	992.575	935.554	864.516	765.448
Abcg1	White	NP_445954	St	ELDVENAK	8	-	-	459.2	675.331	560.304	461.235	332.193
			Is	ELDVENAK	8	7	A	461.2	679.338	564.311	465.243	336.200
Abcg2	Bcrp	NP_852046	St	SLLDVLAAR	10	-	-	522.8	644.373	757.457	529.346	430.277
			Is	SLLDVLAAR	10	7	L	526.3	651.390	764.474	536.363	437.294
Abcg5	Abcg5	NP_446206	St	TTLDAISGR	10	-	-	523.8	844.489	731.405	618.321	503.294
			Is	TTLDAISGR	10	4	L	527.3	851.506	738.422	618.321	503.294

*SLC family*

Slc1a2	Eaat2	NP_001030310	St SELDTIDSQHR	11	-	-	650.8	642.295	971.454	856.427	527.269
			Is SELDTIDSQHR	11	3	L	654.3	642.295	971.454	856.427	527.269
Slc1a4	Asct1	NP_942058	St ETVDSFLDLLR	11	-	-	654.3	629.398	978.526	776.467	516.314
			Is ETVDSFLDLLR	11	10	L	657.9	636.415	985.543	783.484	523.331
Slc2a1	Glut1	NP_620182	St TFDEIASGFR	10	-	-	571.8	537.278	894.432	779.405	650.362
			Is TFDEIASGFR	10	6	A	573.8	541.285	898.439	783.412	654.369
Slc3a2	4f2hc	NP_062156	St VAGSPGWVR	9	-	-	464.8	758.394	614.341	829.432	315.166
			Is VAGSPGWVR	9	9	R	469.8	768.403	624.349	839.440	315.166
Slc4a2	Ae2	NP_058744	St FEEILQEAGSR	11	-	-	639.8	277.118	406.161	519.252	760.388
			Is FEEILQEAGSR	11	11	R	644.8	277.118	406.161	529.260	760.388
Slc6a2	Net	CAA73665	St TADLLVVK	8	-	-	429.8	757.482	686.445	345.250	246.181
			Is TADLLVVK	8	5	L	433.3	764.499	693.462	345.250	246.181
Slc6a6	Taut	NP_058902	St EGATPFHSR	9	-	-	501.2	643.331	546.278	399.21	262.151
			Is EGATPFHSR	9	6	F	506.3	653.358	556.306	399.21	262.151
Slc6a8	Crt1	NP_059044	St GDGPAGLGAPSSR	13	-	-	571.3	574.294	446.236	744.400	568.273
			Is GDGPAGLGAPSSR	13	13	R	576.3	584.303	456.244	754.408	568.273
Slc7a5	Lat1	NP_059049	St VQDAFAAAK	9	-	-	460.7	693.357	360.224	578.330	821.415
			Is VQDAFAAAK	9	7	A	462.7	697.364	364.231	582.337	825.422
Slc7a8	Lat2	NP_445894	St GEFFWLEPK	9	-	-	576.8	672.372	819.440	373.208	966.508
			Is GEFFWLEPK	9	6	L	580.3	679.389	826.457	373.208	973.526
Slc10a2	Asbt	NP_058918	St LAGQPWYR	8	-	-	495.8	877.432	806.394	621.314	524.262
			Is LAGQPWYR	8	5	P	498.8	883.445	812.408	627.328	524.262
Slc15a2	Pept2	NP_113860	St DYGV SAYR	8	-	-	465.7	652.341	496.251	336.119	279.098
			Is DYGV SAYR	8	8	R	470.7	662.350	506.260	336.119	279.098
Slc16a1	Mct1	NP_036848	St SDANTDLIGGSPK	13	-	-	637.8	887.483	786.436	558.325	445.241
			Is SDANTDLIGGSPK	13	7	L	641.3	894.500	793.453	558.325	445.241
Slc16a8	Mct3	NP_113932	St AVSVFFR	7	-	-	413.2	655.356	469.256	568.324	754.425
			Is AVSVFFR	7	6	F	418.2	665.384	479.283	578.351	764.452
Slc19a1	Rfc1	NP_001030309	St DSFLVR	6	-	-	368.7	387.271	534.340	175.119	274.187
			Is DSFLVR	6	6	R	373.7	397.28	544.348	185.127	284.196
Slc21a2	Pgt	XP_006243717	St IFVDYGR	7	-	-	435.2	756.368	609.299	510.231	395.204
			Is IFVDYGR	7	3	V	438.2	762.381	615.313	510.231	395.204
Slc21a1	Oatp1a1	NP_058807	St FTFLPK	6	-	-	376.7	244.166	504.318	605.366	249.123
			Is FTFLPK	6	6	K	380.7	252.180	512.332	613.380	249.123
Slc21a5	Oatp1a4	NP_571981	St ESECTEVLR	9	-	-	561.8	617.362	288.203	516.314	387.271
			Is ESECTEVLR	9	9	R	566.8	627.370	298.211	526.322	397.280
Slc21a7	Oatp1a5	NP_110465	St EGLQDDVDGTNNDK	14	-	-	760.3	763.322	1092.444	648.295	977.417
			Is EGLQDDVDGTNNDK	14	14	K	764.3	771.336	1100.458	656.309	985.431
Slc21a11	Oatp3a1	NP_803434	St SGELQGDEAQR	11	-	-	595.3	675.306	803.364	503.257	916.448
			Is SGELQGDEAQR	11	9	A	597.3	679.313	807.371	507.264	920.455
Slc21a14	Oatp1c1	NP_445893	St DFLPSLK	7	-	-	410.2	557.366	444.282	263.103	376.187
			Is DFLPSLK	7	7	K	414.2	565.380	452.296	263.103	376.187
Slc22a2	Oct2	Q9R0W2	St LNPSFLDLVR	10	-	-	587.3	946.536	849.483	762.451	387.271
			Is LNPSFLDLVR	10	8	L	590.8	953.553	856.500	769.468	394.289
Slc22a3	Oct3	NP_062103	St FLQGVFGK	8	-	-	448.3	635.351	507.293	351.203	748.435
			Is FLQGVFGK	8	6	F	453.3	645.378	517.320	361.230	758.462
Slc22a6	Oat1	NP_058920	St TSLAVLGK	8	-	-	394.7	600.408	487.324	317.218	416.287



			Is	TSLAVLGK	8	7	L	398.3	607.425	494.341	324.236	423.304
Slc22a7	Oat2	NP_445989	St	NLVLLALPR	9	-	-	504.8	781.529	682.461	569.377	456.293
			Is	NLVLLALPR	9	7	L	508.3	788.547	689.478	576.394	463.310
Slc22a8	Oat3	NP_112622	St	YGLSDLFR	8	-	-	485.8	807.436	750.415	637.330	550.298
			Is	YGLSDLFR	8	6	L	489.3	814.453	757.432	644.348	557.316
Slc22a12	Urat1	NP_001030115	St	NLPLPDTIQDIQK	13	-	-	747.9	1170.637	1057.552	960.500	503.282
			Is	NLPLPDTIQDIQK	13	11	I	751.4	1177.654	1064.570	967.517	510.300
Slc29a4	Pmat	NP_001099381	St	LLLPPER	7	-	-	428.3	516.241	742.410	629.325	419.189
			Is	LLLPPER	7	4	P	431.3	522.255	748.423	635.339	419.189
Slc38a1	Ata1	NP_620187	St	NELPSAIK	8	-	-	436.2	515.319	628.403	418.266	331.234
			Is	NELPSAIK	8	7	I	439.8	522.336	635.42	425.283	338.251
Slc38a2	Ata2	NP_851604	St	AYGLAGK	7	-	-	340.2	608.340	445.277	275.171	204.134
			Is	AYGLAGK	7	5	A	342.2	612.347	449.284	279.179	204.134
Slc38a4	Ata3	NP_570104	St	TSVITLLFPR	10	-	-	573.8	859.540	746.456	532.324	419.240
			Is	TSVITLLFPR	10	9	P	576.9	865.554	752.470	538.338	425.254
Slc47a1	Mate1	NP_001014140	St	HVGVILQR	8	-	-	461.3	784.504	685.436	529.346	416.262
			Is	HVGVILQR	8	6	L	464.8	791.521	692.453	536.363	423.279
	Oatp6b1	NP_596903	St	VFPYQIR	7	-	-	461.8	676.378	579.325	416.262	247.144
			Is	VFPYQIR	7	7	R	466.8	686.386	589.333	426.270	247.144
<b>Others</b>												
CD147	CD147	NP_001103352 (isoform 1) NP_036915 (isoform 2 )	St	YTVDADDR	8	-	-	477.7	690.305	591.237	791.353	476.210
			Is	YTVDADDR	8	8	R	482.7	700.314	601.245	801.361	486.218
Phospholipase D (Pld)	Phospholipase D (Pld)	Q64610.2	St	SYSEILTLK	9	-	-	527.3	251.103	716.455	587.413	260.197
			Is	SYSEILTLK	9	9	K	531.3	251.103	724.470	595.427	268.211
<b>Membrane marker</b>												
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase	AAA41671 (α1 subunit), AAA41672 (α2 subunit), NP_036638 (α3 subunit)	St	AAVPDAVGK	9	-	-	414.2	685.388	586.320	489.267	374.240
			Is	AAVPDAVGK	9	7	V	417.2	691.402	592.333	495.281	380.254
<b>Tight junction marker</b>												
claudin5	claudin5	NP_113889	St	EFYDTPVPVSQK	12	-	-	705.3	970.521	855.494	657.393	558.325
			Is	EFYDTPVPVSQK	12	9	V	708.3	976.534	861.507	663.407	564.339
Occludin	Occludin	XP_019486705	St	WTSPPGVIR	9	-	-	506.8	725.430	638.398	541.346	826.478
			Is	WTSPPGVIR	9	8	I	510.3	732.448	645.416	548.363	833.495
<b>Astrocyte marker</b>												
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	NP_058705	St	FASYIEK	7	-	-	429.2	710.372	639.335	389.240	276.155
			Is	FASYIEK	7	5	I	432.7	717.389	646.352	396.257	276.155
<b>Pericyte marker</b>												
neuron-glia antigen 2 (NG2)	neuron-glia antigen 2 (NG2)	NP_112284	St	APLEVPQALGR	11	-	-	575.8	982.568	869.484	740.441	641.373
			Is	APLEVPQALGR	11	9	L	579.3	989.585	876.501	747.459	648.390
<b>Neuron maker</b>												
Synaptophysin (SYP)	Synaptophysin (SYP)	NP_036796	St	EPLGFVK	7	-	-	395.2	563.355	450.271	393.250	246.181

			Is	EPLGFVK	7	6	V	398.2	569.369	456.285	399.263	252.195
<i>Endothelial cell maker</i>												
$\gamma$ -gtp	$\gamma$ -gtp	<a href="#">NP_446292</a>	St	LFQPSIQLAR	10	-	-	586.8	784.468	487.299	912.526	687.415
			Is	LFQPSIQLAR	10	8	L	590.4	791.485	494.316	919.544	694.432

The PRM transitions for peptides were set up as described in the Materials and Methods section. Four PRM transitions (Q1/TOF-1, Q1/TOF-2, Q1/TOF-3, and Q1/TOF-4) were set for each peptide, and consisted of the m/z value of the precursor ion (Q1) and the m/z range of  $m/z \pm 0.025$  for the four product ions (TOF-1, TOF-2, TOF-3, and TOF-4). The m/z values of Q1 were used to measure the target peptides in the MRM-HS mode of the TripleTOF5600. The four transitions were used in the MultiQuant software (AB SCIEX) to extract the data of the target peptides from the raw data obtained in the MRM-HS analysis and to quantify them.  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  were used for amino acid labeling in the internal standard peptides (stable-isotope-labeled peptides). The amino acid sequence of probe peptide is specific for the target molecule, but is often common among its isoforms. The Genbank Accession Number of only one isoform is described in this table. AA, amino acid; St, standard; Is, internal standard.

#### 第 4 節 ブタ網膜毛細血管、網膜色素上皮細胞、脳毛細血管、脈絡叢における輸送担体タンパク質発現量解析

##### Preparation of a crude membrane fraction of retinal capillary and retinal pigment epithelium

Retina was isolated from enucleated porcine eyes and kept on ice. After that, RPE cells were gently collected from the anterior part of the eye ball with a small paintbrush. For the preparation of a retinal capillary fraction, the retina was minced and homogenized with a Potter-Elvehjem glass homogenizer in five volumes of solution A (101 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 15 mM HEPES; pH 7.4) with 20 times hand strokes, followed by centrifugation at 1,000 g for 10 min at 4°C. The pellet was resuspended by 5 times volume of solution A and mixed with an equal volume of 35% dextran-containing solution A. After the centrifugation at 4,500 g for 15 min at 4°C, the pellet was resuspended in solution A containing 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM D-glucose, and 1 mM pyruvate and passed through 210 µm and 20 µm nylon mesh sheets. The retinal capillaries retained by the 20 µm nylon mesh sheet were collected with 10 times volume of solution A containing 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM D-glucose, and 1 mM pyruvate, and centrifuged at 1,000 g for 5 min at 4°C. After washing the pellet rinsed with solution A containing 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM D-glucose, and 1 mM pyruvate, microscopic analysis was performed to check whether the prepared samples contained predominantly retinal capillaries (FigureS4-1).

For the preparation of a crude membrane fraction (intracellular membrane + plasma membrane), the isolated retinal capillaries and RPE cells were resuspended with hypotonic lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM NaCl, 0.15 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7.4). The retinal capillary suspension was homogenized with a Potter-Elvehjem glass homogenizer with 20 times strokes, and RPE cells suspension was sonicated. These samples were disrupted by nitrogen capitation at 900 psi for 30 min at 4°C, followed by centrifugation at 2,000 g for 5 min at 4°C. The supernatant was additionally centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C. The resultant supernatant was ultracentrifuged for at 100,000 g for 60 min at 4°C. The pellet was collected as a crude membrane fraction of isolated retinal capillary and RPE. Protein concentrations were measured by the Lowry

method using the DC protein assay reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The recovery rates of crude membrane fractions of isolated retinal capillary and RPE were 6.57  $\mu\text{g}$  protein/g wet tissue of isolated retina and 362  $\mu\text{g}$  protein/g wet tissue of isolated RPE, respectively. The crude membrane fractions were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Preparation of plasma membrane fraction of porcine brain capillary.

Brain capillary-rich samples were prepared as described previously (Kubo et al., 2015). Briefly, cerebrums of porcine brains, including gray matter and white matter, were minced in ice-cold solution A. The brain was minced and homogenized with a 100-mL Potter-Elvehjem glass homogenizer in 4 mL of solution A per g tissue of cerebrum, 25 up-and-down hand strokes and no rotation. The homogenized samples were centrifuged for 15 min at 1,000 g,  $4^{\circ}\text{C}$ . The pellet was resuspended in solution A, and mixed with an equal volume of 32% dextran-containing solution A, followed by centrifugation for 30 min at 4,500 g and  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was transferred to a new tube, and centrifuged again for 30 min at 4,500 g and  $4^{\circ}\text{C}$ , again. The two resulting pellets were suspended and mixed in solution B (solution A containing 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mM glucose, 1 mM pyruvate, and 5 g/L bovine serum albumin) and passed through 210- and 20- $\mu\text{m}$  nylon mesh sheets. The porcine brain capillaries retained by the 20- $\mu\text{m}$  nylon mesh sheet were suspended in solution B, and centrifuged for 30 min at 1,000 g and  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was discarded and the pellet was suspended in 1 mL solution A, and centrifuged for 5 min at 1,000 g and  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was discarded and the pellet was suspended in 1 mL of solution A. This suspension was centrifuged at 1,000 g for 5 min at  $4^{\circ}\text{C}$  after observation of brain capillaries through a microscope (FigureS4- 2).

For the preparation of a plasma membrane fraction, the isolated brain capillary pellet was suspended with hypotonic buffer in a 10-mL Potter-Elvehjem glass homogenizer, by 10 up-and-down strokes with rotation (1,800 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ). The suspension was then moved to a 7-mL Dounce tight glass homogenizer by 40 up-and-down hand strokes without rotation, followed by centrifugation at 2,000 g for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , to collect supernatant [supernatant 1]. The pellet was suspended with hypotonic buffer in a 7-mL Dounce tight glass homogenizer by 20 up-and-down hand strokes without rotation. The suspension was subjected to nitrogen cavitation at 800 psi for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The

homogenate was centrifuged at 2,000 g for 10 min at 4°C and the supernatant [supernatant 2] was collected. The pellet was resuspended in hypotonic buffer to a 7-mL Dounce tight glass homogenizer by 20 up-and-down hand strokes without rotation, then subjected to nitrogen cavitation at 800 psi for 15 min at 4°C, and the suspension was subjected to nitrogen cavitation at 800 psi for 15 min at 4°C, again, and followed by centrifugation at 2,000 g for 10 min at 4°C to collect the supernatant [supernatant 3]. The pellet was resuspended in hypotonic buffer to a 7-mL Dounce tight glass homogenizer and by 20 up-and-down hand strokes without rotation, then subjected to nitrogen cavitation at 800 psi for 15 min at 4°C, and the suspension was subjected to nitrogen cavitation at 800 psi for 15 min at 4°C, again. The homogenate was centrifuged at 2,000 g for 10 min at 4°C and the supernatant [supernatant 4] was collected. Supernatant 1-4 were mixed, together with 1 M MgSO<sub>4</sub> (final concentration: 10 mM). MgSO<sub>4</sub> is considered to prompt the precipitation of debris (such as nucleus, mitochondria) when the sample is centrifuged. Those mixed supernatants were centrifuged at 3,000 g for 10 min at 4°C. The resultant supernatant was centrifuged at 100,000 g for 40 min at 4°C, and then the pellets were suspended in suspension buffer, layered on top of a 38% (w/v) sucrose solution, and centrifuged at 100,000 g for 40 min at 4°C. The turbid layer at the interface was recovered, suspended in suspension buffer, and centrifuged at 100,000 g for 40 min at 4°C. The resultant pellets were suspended in the suspension buffer to obtain the plasma membrane fractions. Protein concentrations were measured by the Lowry method using the DC protein assay reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The recovery rate of plasma membrane fraction of isolated brain capillary was 2.84 µg protein/g wet tissue of brain cerebrum. The plasma membrane fractions were stored at -80°C.

#### Preparation of a plasma membrane fraction of porcine choroid plexus.

Choroid plexuses of the third, lateral, and forth ventricle were isolated from porcine brains and the plasma membrane fractions were prepared as described previously (Uchida et al., 2015). The recovery rate of plasma membrane fraction of isolated choroid plexus was 463 µg protein/g wet tissue of isolated choroid plexus. The plasma membrane fractions were stored at -80°C.

#### Lysyl endopeptidase and trypsin digestion.

The plasma membrane fractions of isolated porcine brain capillary and choroid plexus (50 µg protein/aliquot × 4 aliquots = 200 µg protein in total for each tissue) and crude membrane fractions of isolated porcine retinal capillary and RPE (50 µg protein/aliquot × 4 aliquots = 200 µg protein in total for isolated retinal RPE, 50 µg protein/aliquot × 1 aliquot = 50 µg protein in total for isolated retinal capillary) were subjected to LysC and trypsin digestion as described previously (Uchida et al., 2015).

#### Clean-up of peptide samples for LC-MS/MS analysis.

Samples were prepared as described previously (Uchida et al., 2015).

#### Parallel reaction monitoring (PRM) in nanoLC-TripleTOF5600 system.

The LC-MS/MS system consisted of a NanoLC-Ultra 1Dplus system (Eksigent Technologies, Dublin, CA, USA) coupled with a cHiPLC-nanoflex system (Eksigent Technologies) and a TripleTOF5600 (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) equipped with a NanoSpray III ion source (AB SCIEX). Mobile phases A and B consisted of 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in acetonitrile, respectively. The cleaned-up peptide samples were loaded onto the trap column (200 µm x 6 mm, ReproSil-Pur 3µm, C18-AQ 120A°) (Eksigent Technologies) and separated on an analytical column (75 µm x 15 cm, ReproSil-Pur 3µm, C18-AQ 120A°) (Eksigent Technologies) with injection amounts corresponding to 1 µg protein. The flow rates were 2 µL/min (6 minutes run-time) and 300 nL/min, respectively. The peptides were separated and eluted from the column at a flow rate of 300 nL/min with a linear gradient as follows: 0-40% B (0-40 min), rapidly increased to 100% B (40-41 min), maintained at 100% B (41-50 min), rapidly reduced to 0% B for 0.1 min (50-50.1 min), and then maintained at 0% B (50.1-80 min). The eluted peptides were sprayed from a SilicaTip emitter (New Objective, Woburn, MA, USA) and positively ionized with the NanoSpray III ion source of the TripleTOF5600. The source/gas parameters were the same as previously reported (Armania et al., 2016). Measurements of unlabeled and stable-isotope labeled peptides were acquired in the MRM-High Sensitivity (MRM-HS)

mode. The  $m/z$  values of Q1 listed in the Table S1 were set to measure the target peptides. The product ions were scanned with a MS/MS range of 100 to 1600  $m/z$ . 40 peptides (20 unlabeled and the corresponding 20 stable-isotope labeled ones) were simultaneously measured at maximum in a run. The accumulation time was 0.05 second for each target peptide, and therefore the cycle time was 2 second in the case of simultaneous measurement of 40 peptides. Auto calibration with  $\beta$ -galactosidase was performed every 4 runs.

Data analysis was performed as previously described (Uchida et al., 2015).

#### Calculation of protein expression levels.

Using the LysC and trypsin digested samples [four aliquots (50  $\mu$ g protein each) for isolated retinal RPE, brain capillary and choroid plexus, while one aliquot (50  $\mu$ g protein) for isolated retinal capillary], all of the target molecules in each tissue were measured by LC-MS/MS four times, that means, single injection/sample  $\times$  four samples for isolated retinal RPE, brain capillary and choroid plexus, respectively; four injections/sample  $\times$  one sample for isolated retinal capillary. The protein expression levels of each measurement were calculated as described by Uchida et al (Uchida et al., 2015). The final values given in Table 1 were calculated as the average of the four measurements for each tissue.

#### Calculation of the limit of quantification.

The value of the limit of quantification (LQ, fmol/ $\mu$ g protein) was determined as described by Uchida et al. (Uchida et al., 2015).

#### Setup of PRM conditions of target peptides.

Prior to quantitative analysis of all samples by nanoLC-TripleTOF5600, the PRM conditions of target peptides including the four transitions (Table S4-1) and collision energies were set up as described previously (Uchida et al., 2015).

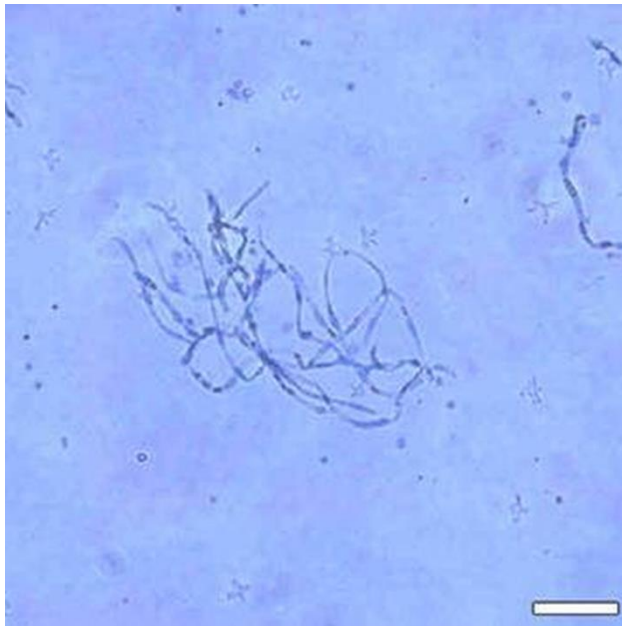


Figure S4-1 Photograph of capillaries prepared from porcine retina

The capillaries were isolated from frozen porcine retina by the nylon mesh technique and stained with 0.2% trypan blue/PBS (-). 20 × magnification. Scale bar = 50 μm.



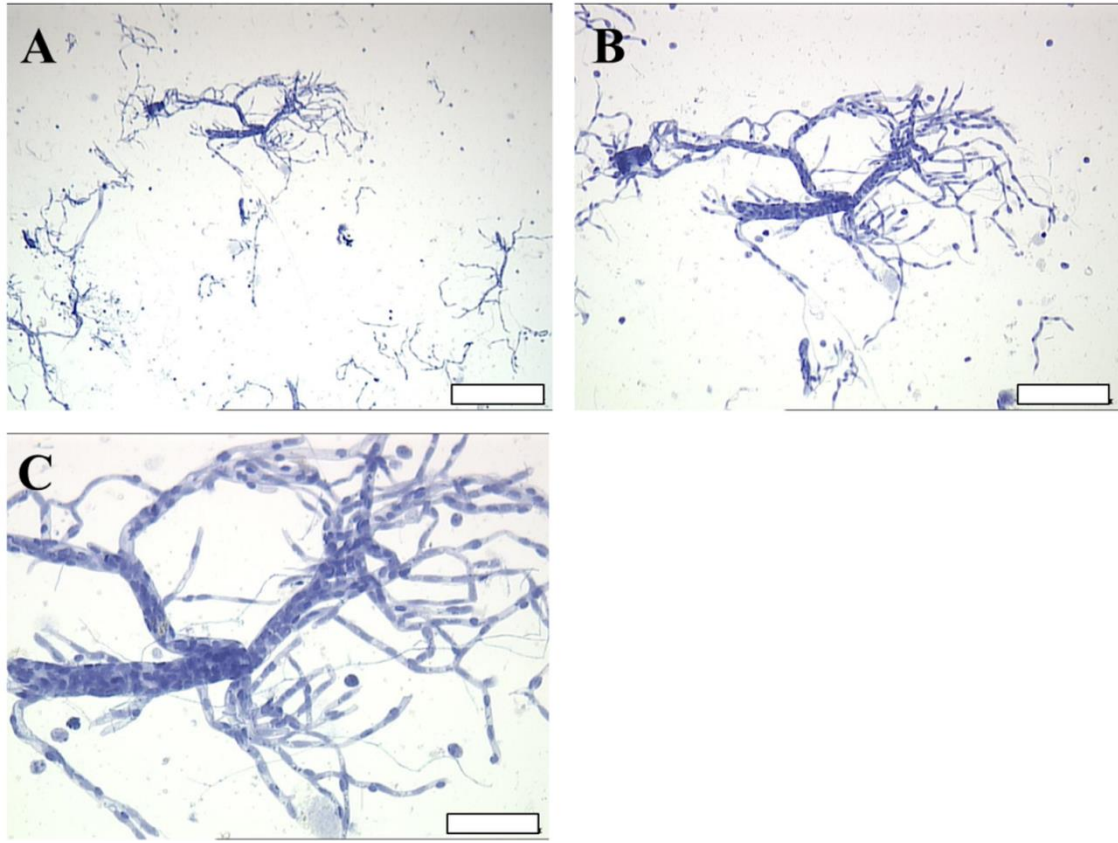


Figure S4-2 Photograph of capillaries prepared from porcine brain

The capillaries were isolated from frozen porcine brain by the nylon mesh technique and stained with 0.2% trypan blue/PBS(-). Scale bar = 400  $\mu\text{m}$  for A. Scale bar = 200  $\mu\text{m}$  for B. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$  for C.

Table S4-1 Target peptide transitions in LC-MS/MS analysis

Gene Symbol	Alias	Genbank Accession Number	St or Is	Probe Sequence	Number of AA	Position of stable isotope-labeled AA from N terminal	stable isotope-labeled AA	PRM transition				
								Q1 (m/z)	TOF range (m/z ± 0.025)			
									1	2	3	4
ABC family												
ABCA1	ABC1	NP_001304009.1	St	FVSPLSWDLVGR	12	-	-	688.4	1129.600	1042.568	832.431	945.515
			Is	FVSPLSWDLVGR	12	9	L	691.9	1136.617	1049.585	839.448	952.533
ABCA5	ABCA5	XP_013836267.1	St	NAVVPPIK	7	-	-	370.7	357.250	555.387	456.318	626.424
			Is	NAVVPPIK	7	6	I	374.2	364.267	562.404	463.335	633.441
ABCA8,10	ABCA8 ABC10	XP_013842335.1, ABCA8 XP_013836265.1, ABC10	St	LFPQAAR	7	-	-	401.7	542.305	445.252	317.193	689.373
			Is	LFPQAAR	7	6	A	403.7	546.312	449.259	321.200	693.380
ABCB1	MDR1	NP_001295175.1	St	NTTGALTTR	9	-	-	467.8	618.357	719.405	490.298	561.336
			Is	NTTGALTTR	9	6	L	471.3	625.374	726.422	497.316	568.353
ABCB4	MDR3	XP_005656751.1, isoform X1 XP_013845051.1, isoform X2 XP_005656752.1, isoform X3	St	IATEAIENIR	10	-	-	565.3	531.289	715.410	644.373	844.452
			Is	IATEAIENIR	10	5	A	567.3	531.289	719.417	644.373	848.460
ABCB11	BSEP	XP_003133505.2, isoform X1 XP_013839693.1, isoform X2 XP_013839694.1, isoform X3	St	STALQLIQR	9	-	-	515.3	529.346	657.404	841.526	770.489
			Is	STALQLIQR	9	6	L	518.8	536.363	664.422	848.543	777.506
ABCC1	MRP1	XP_013851081.1, isoform X1 XP_013851082.1, isoform X2	St	TPSGNLVNR	9	-	-	479.3	759.411	672.379	501.314	615.357
			Is	TPSGNLVNR	9	6	L	482.8	766.428	679.396	508.332	622.375
ABCC2	MRP2	XP_001929394.1	St	VLGPNGLLK	9	-	-	455.8	698.420	641.398	811.504	430.302
			Is	VLGPNGLLK	9	9	9	459.8	706.434	649.412	819.518	438.317
ABCC4	MRP4	XP_020921059.1	St	APVLFFDR	8	-	-	482.8	584.283	697.367	796.435	893.488
			Is	APVLFFDR	8	4	L	486.3	584.283	704.384	803.452	900.505
ABCC5	MRP5	XP_013834479.1	St	SLSEASVAVDR	11	-	-	567.3	646.352	717.389	933.464	559.320
			Is	SLSEASVAVDR	11	2	L	570.8	646.352	717.389	933.464	559.320
ABCC8,9	SUR1,2	XP_005661159.1, SUR1_isoform X1 XP_005661160.1, SUR1_isoform X2 XP_003122994.3, SUR1_isoform X3 XP_013843800.1, SUR2	St	TVVTIAHR	8	-	-	551.8	696.415	597.347	496.299	795.484
			Is	TVVTIAHR	8	6	A	555.3	700.422	601.354	500.306	799.491
ABCC10	MRP7	XP_013833415.1	St	VFTALALVR	9	-	-	495.3	743.478	571.393	458.309	642.430
			Is	VFTALALVR	9	7	L	498.8	750.495	578.410	465.326	649.447

ABCG2	BCRP	NP_999175.1	St SLLLDVLAAR	10	-	-	522.8	644.373	757.457	529.346	430.277
			Is SLLLDVLAAR	10	7	L	526.3	651.390	764.474	536.363	437.295
ABCG4	White2	XP_013834921.1	St GVVVTNLIPYLK	11	-	-	608.9	520.313	633.397	961.572	746.481
			Is GVVVTNLIPYLK	11	10	L	612.4	527.330	640.414	968.589	753.499
ABCG8	ABCG8	XP_013843362.1	St ASLLDVITGR	10	-	-	522.8	660.368	545.341	446.272	773.452
			Is ASLLDVITGR	10	4	L	526.3	660.368	545.341	446.272	780.469
<i>SLC family</i>											
SLC2A1	GLUT1	XP_013832813.1	St TFDEIASGFR	10	-	-	571.7	537.278	894.432	779.405	650.362
			Is TFDEIASGFR	10	6	A	573.7	541.285	898.439	783.412	654.369
SLC16A1	MCT1	NP_001121917.1	St SITVFFK	7	-	-	421.2	641.366	294.181	441.250	540.318
			Is SITVFFK	7	6	F	426.2	651.393	304.209	451.277	550.345
SLC16A3	MCT4	XP_013845288.1	St LLDLSVFR	8	-	-	481.8	849.483	736.399	621.372	508.288
			Is LLDLSVFR	8	7	F	486.8	859.510	746.426	631.399	518.315
SLC16A7	MCT2	XP_003126385.1	St AVTVFFK	7	-	-	406.2	641.366	441.250	294.181	540.318
			Is AVTVFFK	7	6	F	411.2	651.393	451.277	304.209	550.345
SLC16A8	MCT3	XP_003126076.1	St AVSVFFR	7	-	-	413.2	655.356	469.256	568.324	754.425
			Is AVSVFFR	7	6	F	418.2	665.383	479.283	578.351	764.452
SLC21A11	OATP3A1	XP_005666353.1, isoform X1 XP_001924382.3, isoform X2	St SGELQGDEAQR	11	-	-	595.3	675.306	803.364	503.257	916.448
			Is SGELQGDEAQR	11	9	A	597.3	679.313	807.371	507.264	920.456
SLC22A3	OCT3	XP_003121154.1, isoform X1 XP_013847890.1, isoform X2 XP_013847891.1, isoform X3	St FLQGVFGK	8	-	-	448.2	635.351	507.293	351.203	748.435
			Is FLQGVFGK	8	6	F	453.2	645.379	517.320	361.230	758.463
SLC27A1	FATP1	NP_001077400.1	St LLPQVDTTGTFK	12	-	-	660.4	1093.553	227.176	868.441	769.373
			Is LLPQVDTTGTFK	12	11	F	665.4	1103.580	227.176	878.468	779.400
SLC29A2	ENT2	XP_013849510.1, isoform X1 XP_003122355.1, isoform X3	St SLTSYFLWPDEDSR	14	-	-	858.4	718.300	904.380	1164.532	1017.464
			Is SLTSYFLWPDEDSR	14	9	P	861.4	724.314	910.393	1170.546	1023.477
SLC29A4	PMAT	XP_013850798.1	St LLLPDER	7	-	-	428.3	516.241	742.410	629.325	419.189
			Is LLLPDER	7	4	P	431.3	522.255	748.423	635.339	419.189
SLC38A1	ATA1	XP_003355677.1	St NELPSAIK	8	-	-	436.3	515.319	628.403	418.266	331.234
			Is NELPSAIK	8	7	I	439.8	522.336	635.420	425.283	338.251
SLC38A4	ATA3	XP_013853419.1, isoform X1 XP_013853420.1, isoform X3	St YELPEVIR	8	-	-	509.8	613.367	726.451	855.494	516.314
			Is YELPEVIR	8	7	I	513.3	620.384	733.468	862.511	523.331
<i>Marker protein</i>											
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase	NP_999414.1, subunit α1 NP_001165012.1, subunit α2 NP_001165224.1, subunit α3	St AAVPDAVGK	9	-	-	414.2	685.388	586.320	489.267	374.240
			Is AAVPDAVGK	9	7	V	417.2	691.402	592.333	495.281	380.254
<i>Others</i>											

Villin-1	Villin-1	XP_001925202.2, isoform X1 XP_013839944.1, isoform X3	St DPETPIIVVK	10	-	-	555.8	668.471	769.518	246.181	345.250
			Is DPETPIIVVK	10	10	K	559.8	676.485	77.532	254.195	353.264
RLIP76	RLIP76	XP_003127878.3	St DLPENLLTK	9	-	-	521.8	814.467	717.414	588.372	474.329
			Is DLPENLLTK	9	7	L	525.3	821.484	724.431	595.389	481.346

The PRM transitions for peptides were set up as described in the Materials and Methods section. Four PRM transitions (Q1/TOF-1, Q1/TOF-2, Q1/TOF-3, and Q1/TOF-4) were set for each peptide, and consisted of the m/z value of the precursor ion (Q1) and the m/z range of  $m/z \pm 0.025$  for the four product ions (TOF-1, TOF-2, TOF-3, and TOF-4). The m/z values of Q1 were used to measure the target peptides in the MRM-HS mode of the TripleTOF5600. The four transitions were used in the MultiQuant software (AB SCIEX) to extract the data of the target peptides from the raw data obtained in the MRM-HS analysis and to quantify them.  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  were used for amino acid labeling in the internal standard peptides (stable-isotope-labeled peptides). The amino acid sequence of probe peptide is specific for the target molecule, but often common among its isoforms. The Genbank Accession Number of only one isoform is described in this table. AA, amino acid; St, standard; Is, internal standard.

## 参考文献

- Adachi, H., Suzuki, T., Abe, M., Asano, N., Mizutamari, H., Tanemoto, M., et al. (2003) Molecular characterization of human and rat organic anion transporter OATP-D. *Am J Physiol Renal Physiol.* **285**: 1188–1197.
- Agarwal, S.; Uchida, Y.; Mittapalli, R. K.; Sane, R.; Terasaki, T.; Elmquist, W. F. (2012) Quantitative Proteomics of Transporter Expression in Brain Capillary Endothelial Cells Isolated from P-Glycoprotein (P-Gp), Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp), and P-gp/Bcrp Knockout Mice. *Drug Metab. Dispos.* **40**: 1164–1169.
- Ahn, J., Beharry, S., Molday, L. L. and Molday, R. S. (2003) Functional interaction between the two halves of the photoreceptor-specific ATP binding cassette protein ABCR (ABCA4). Evidence for a non-exchangeable ADP in the first nucleotide binding domain. *J Biol Chem*, **278**: 39600-39608.
- Alcolado, R.; Weller, R. O.; Parrish, E. P.; Garrod, D. (1988) The cranial arachnoid and pia mater in man : anatomical and ultrastructural observations. *Neuropathol Appl Neurobiol* **14**: 1-17.
- Alm, A.; Törnquist, P. (1985) Lactate transport through the blood-retinal and the blood-brain barrier in rats. *Ophthalmic Res.* **7**: 181-184.
- Arunchaipong, K.; Sattayasai, N.; Sattayasai, J.; Svasti, J.; Rimlumduan, T. A (2009) Biotin-Coupled Bifunctional Enzyme Exhibiting Both Glutamine Synthetase Activity and Glutamate Decarboxylase Activity. *Curr. Eye Res.* **34**: 809–818.
- Asaba, H., Hosoya, K., Takanaga, H., Ohtsuki, S., Tamura, E., Takizawa, T. and Terasaki, T. (2000) Blood-brain barrier is involved in the efflux transport of a neuroactive steroid, dehydroepiandrosterone sulfate, via organic anion transporting polypeptide 2. *J Neurochem*, **75**: 1907-1916.
- Asashima, T.; Hori, S.; Ohtsuki, S.; Tachikawa, M.; Watanabe, M.; Mukai, C.; Kitagaki, S.; Miyakoshi, N.; Terasaki, T. (2006) ATP-Binding Cassette Transporter G2 Mediates the Efflux of Phototoxins on the Luminal Membrane of Retinal Capillary Endothelial Cells. *Pharm. Res.* **23**: 1235–1242.
- Baehr, C.; Reichel, V.; Fricker, G. (2006) Choroid Plexus Epithelial Monolayers--a Cell Culture Model from Porcine Brain. *Cerebrospinal Fluid Res.* **3**: 13.

- Balogh, L. M.; Kimoto, E.; Chupka, J.; Zhang, H.; Lai, Y. (2013) Membrane Protein Quantification by Peptide-Based Mass Spectrometry Approaches: Studies on the Organic Anion-Transporting Polypeptide Family. *Proteomics & Bioinformatics*. **6**: 229–236.
- Bass, N. H.; Lundborg, P. (1973) Postnatal Development of Bulk Flow in the Cerebrospinal Fluid System of the Albino Rat: Clearance of Carboxyl-(14 C)inulin after Intrathecal Infusion. *Brain Res.* **52**: 323–332.
- Berezowski, V.; Laudry, C.; Dehouck, M. P.; Cecchelli, R.; Fenart, L. (2004) Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood–brain barrier. *Brain Res.* **1018**: 1-9.
- Bhongsatiern, J., Ohtsuki, S., Tachikawa, M., Hori, S. and Terasaki, T. (2005) Retinal-specific ATP-binding cassette transporter (ABCR/ABCA4) is expressed at the choroid plexus in rat brain. *J Neurochem*, **92**: 1277-1280.
- Boulton, M.; Rózanowska, M.; Rózzanowski, B. (2001) Retinal Photodamage. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **64**: 144–161.
- Bowyer, J. F.; Thomas, M.; Patterson, T. A.; George, N. I.; Runnells, J. A.; Levi, M. S. (2012) A Visual Description of the Dissection of the Cerebral Surface Vasculature and Associated Meninges and the Choroid Plexus from Rat Brain. *J. Vis. Exp.* **69**: e4285
- Braun, C.; Sakamoto, A.; Fuchs, H.; Ishiguro, N.; Suzuki, S.; Cui, Y.; Klinder, K.; Watanabe, M.; Terasaki, T.; Sauer, A. (2017) Quantification of Transporter and Receptor Proteins in Dog Brain Capillaries and Choroid Plexus: Relevance for the Distribution in Brain and CSF of Selected BCRP and P-gp Substrates. *Mol Pharm.* **14**: 3436-3447.
- Brun, V.; Dupuis, A.; Adrait, A.; Thomas, D.; Court, M. Isotope-Labeled Protein Standards. (2007) *Mol. Cell. Proteomics* **6**: 2139–2149.
- Brun, V.; Masselon, C.; Garin, J.; Dupuis, A. (2009) Isotope Dilution Strategies for Absolute Quantitative Proteomics. *J. Proteomics* **72**: 740–749.
- Cattori, V., van Montfoort, J. E., Stieger, B., Landmann, L., Meijer, D. K., Winterhalter, K. H., Meier, P. J. and Hagenbuch, B. (2001) Localization of organic anion

- transporting polypeptide 4 (Oatp4) in rat liver and comparison of its substrate specificity with Oatp1, Oatp2 and Oatp3. *Pflugers Arch*, **443**: 188-195.
- Chapy, H.; André, P.; Declèves, X.; Scherrmann, J. M.; Cisternino, S. (2015) A Polyspecific Drug/proton Antiporter Mediates Diphenhydramine and Clonidine Transport at the Mouse Blood-Retinal Barrier. *Br. J. Pharmacol.* **172**: 4714–4725.
- Chapy, H.; Saubaméa, B.; Tournier, N.; Bourasset, F.; Behar-Cohen, F.; Declèves, X.; Scherrmann, J. M.; Cisternino, S. (2016) Blood-Brain and Retinal Barriers Show Dissimilar ABC Transporter Impacts and Concealed Effect of P-Glycoprotein on a Novel Verapamil Influx Carrier. *Br. J. Pharmacol.* **173**: 497–510.
- Chen, X., Keep, R. F., Liang, Y., Zhu, H. J., et al. (2017) Influence of peptide transporter 2 (PEPT2) on the distribution of cefadroxil in mouse brain: A microdialysis study. *Biochem Pharmacol.* **131**: 89–97.
- Ci, L., Kusuhara, H., Adachi, M., Schuetz, J. D., Takeuchi, K. and Sugiyama, Y. (2007) Involvement of MRP4 (ABCC4) in the luminal efflux of ceftizoxime and cefazolin in the kidney. *Mol Pharmacol*, **71**: 1591-1597.
- Cushing, H. The third circulation and its channels. Matson DD(ed): Harvey Cushing: Selected Papers on Neurosurgery. Yale University Press, New Haven, 1969, pp289-31.
- Cushing, H. (1914) Studies on the cerebrospinal fluid. *J Med Res* **31**: 1-19.
- Dahlin, A.; Geier, E.; Stocker, S. L.; Cropp, C. D.; Grigorenko, E.; Bloomer, M.; Siegenthaler, J.; Xu, L.; Basile, A. S.; Tang-liu, D. D.; Giacomini, K. M. (2013) Gene Expression Profiling of Transporters in the Solute Carrier and ATP-Binding Cassette Superfamilies in Human Eye Substructures. *Mol. Pharm.* **10**: 650-663.
- Deeley, R. G., Cole, SPC. (2006) Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Lett.* **580**:1103–11.
- Coben, L. A., Cotlier, E., Beaty, C., Becker, B. (1971) Transport of amino acids by rabbit choroid plexus. **30**: 67–82.
- Dohrmann, G. J. (1970) The Choroid Plexus: A Historical Review. *Brain Res.* **18**:197–218.
- Duan, H. and Wang, J. (2013) Impaired monoamine and organic cation uptake in choroid plexus in mice with targeted disruption of the plasma membrane

- monoamine transporter (Slc29a4) gene. *J Biol Chem*, **288**: 3535-3544.
- Dyer, J., Barker, P. J. and Shirazi-Beechey, S. P. (1997) Nutrient regulation of the intestinal Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter (SGLT1) gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, **230**: 624-629.
- Engelhardt, B.; Sorokin, L. (2009) The Blood – Brain and the Blood – Cerebrospinal Fluid Barriers : Function and Dysfunction. *Rev. Lit. Arts Am.* 497–511.
- Fraunfelder, F. W.; Fraunfelder, F. T.; Illingworth, D. R. (1995) Adverse Ocular Effects Associated with Niacin Therapy. *Br. J. Ophthalmol.* **79**: 54–56.
- Friden, M., Winiwarter, S., Jerndal, G., Bengtsson, O., Wan, H., Bredberg, U., Hammarlund-Udenaes, M. and Antonsson, M. (2009) Structure-brain exposure relationships in rat and human using a novel data set of unbound drug concentrations in brain interstitial and cerebrospinal fluids. *J Med Chem*, **52**: 6233-6243.
- Gao, B., Stieger, B., Noé, B., et al. (1999) Localization of the Organic Anion Transporting Polypeptide 2 (Oatp2) in Capillary Endothelium and Choroid Plexus Epithelium of Rat Brain. *J Histochem Cytochem.* **47**: 1255–63.
- Gazzin, S.; Strazielle, N.; Schmitt, C.; Fevre-Montange, M.; Ostrow, J. D.; Tiribelli, C.; Ghersi-Egea, J. F. (2008) Differential Expression of the Multidrug Resistance-Related Proteins ABCb1 and ABCc1 between Blood-Brain Interfaces. *J. Comp. Neurol.* **510**: 497–507.
- Gelatt, K. N.; Van Der Woerd, A.; Ketrang, K. L.; Andrew, S. E.; Brooks, D. E.; Biros, D. J.; Denis, H. M.; Cutler, T. J. (2001) Enrofloxacin-Associated Retinal Degeneration in Cats. *Vet. Ophthalmol.* **4**: 99–106.
- Gerhart, D. Z.; Leino, R. L.; Drewes, L. R. (1999) Distribution of Monocarboxylate Transporters MCT1 and MCT2 in Rat Retina. *Neuroscience* **92**: 367–375.
- Gideon, P., Thomsen, C., Stahlberg, F. and Henriksen, O. (1994) Cerebrospinal fluid production and dynamics in normal aging: a MRI phase-mapping study. *Acta Neurol Scand*, **89**: 362-366.
- Gnana-Prakasam, J. P.; Reddy, S. K.; (2011) Veeranan-Karmegam, R.; Smith, S. B.; Martin, P. M.; Ganapathy, V. Polarized Distribution of Heme Transporters in Retinal Pigment Epithelium and Their Regulation in the Iron-Overload Disease



- Hemochromatosis. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**: 9279–9286.
- Grapp, M., Wrede, A., Schweizer, M., et al. (2013) Choroid plexus transcytosis and exosome shuttling deliver folate into brain parenchyma. *Nat Commun.* **4**: 2123.
- Guduric-Fuchs, J.; Ringland, L. J.; Gu, P.; Dellett, M.; Archer, D. B.; Cogliati, T. (2009) Immunohistochemical Study of Pig Retinal Development. *Mol. Vis.* **15**: 1915–1928.
- Gulberg, H. C.; Ashcroft, G. W.; Crawford B., T. B. (1966) Concentrations of 5-Hydroxyindolylacetic acid and Homovanillic acid in the Cerebrospinal Fluid of the Dog Before and During Treatment with Probenecid. *Life Sci.* **5**: 1571–1575.
- Harik, S. I., Kalaria, R. N., Andersson, L., et al. (1990) Immunocytochemical localization of the erythroid glucose transporter: abundance in tissues with barrier functions. *J Neurosci.* **10**: 3862–72.
- Hendrickson, A.; Hicks, D. (2002) Distribution and Density of Medium- and Short-Wavelength Selective Cones in the Domestic Pig Retina. *Exp. Eye Res.* **74**: 435–444.
- Hilgetag, C. C.; Barbas, H. (2009) Sculpting the Brain. *Sci. Am.* **300**: 66-71.
- Hinken, M., Halwachs, S., Kneuer, C., Honscha, W. (2011) Subcellular localization and distribution of the reduced folate carrier in normal rat tissues. *Eur J Histochem.* **55**: 11–8.
- Hoshi, Y., Uchida, Y., Tachikawa, M., Inoue, T., Ohtsuki, S. and Terasaki, T. (2013) Quantitative atlas of blood-brain barrier transporters, receptors, and tight junction proteins in rats and common marmoset. *J Pharm Sci*, **102**: 3343-3355.
- Hosoya, K., Hori, S., Ohtsuki, S., & Terasaki, T. (2004). A new in vitro model for blood-cerebrospinal fluid barrier transport studies: an immortalized choroid plexus epithelial cell line derived from the tsA58 SV40 large T-antigen gene transgenic rat. *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**: 1875–85.
- Hosoya, K. I.; Minamizono, A.; Katayama, K.; Terasaki, T.; Tomi, M. (2004) Vitamin C Transport in Oxidized Form across the Rat Blood-Retinal Barrier. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**: 1232–1239.
- Hosoya, K. I.; Tachikawa, M. (2009) Inner Blood-Retinal Barrier Transporters: Role of Retinal Drug Delivery. *Pharm. Res.* **26**: 2055–2065.

- Hosoya, K. I.; Yamamoto, A.; Akanuma, S. I.; Tachikawa, M. (2010) Lipophilicity And Transporter Influence On Blood-Retinal Barrier Permeability: A Comparison with Blood-Brain Barrier Permeability. *Pharm. Res.* **27**: 2715–2724.
- Hosoya, K.; Lee, V. H. L.; Kim, K.-J. (2005) Roles of the Conjunctiva in Ocular Drug Delivery: A Review of Conjunctival Transport Mechanisms and Their Regulation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **60**: 227–240.
- Hu, Y., Shen, H., Keep, R. F. and Smith, D. E. (2007) Peptide transporter 2 (PEPT2) expression in brain protects against 5-aminolevulinic acid neurotoxicity. *J Neurochem*, **103**: 2058-2065.
- Huber, R. D., Gao, B., Sidler Pfandler, M. A., et al. (2006) Characterization of two splice variants of human organic anion transporting polypeptide 3A1 isolated from human brain. *AJP Cell Physiol.* **292**: 795–806.
- Hughes, S.; Chan-Ling, T. (2004) Characterization of Smooth Muscle Cell and Pericyte Differentiation in the Rat Retina in Vivo. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**: 2795–2806.
- Iloff, J. J.; Wang, M.; Liao, Y.; Plogg, B. A.; Peng, W.; Gundersen, G. A.; Benveniste, H.; Vates, G. E.; Deane, R.; Goldman, S. A.; Nagelhus, E. A.; Nedergaard, M. (2012) A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid. *Sci. Transl. Med.* **4**: 1–13.
- Janoria, K. G.; Boddu, S. H. S.; Wang, Z.; Paturi, D. K.; Samanta, S.; Pal, D.; Mitra, A. K. (2009) Vitreal Pharmacokinetics of Biotinylated Ganciclovir: Role of Sodium-Dependent Multivitamin Transporter Expressed on Retina. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **25**: 39–49.
- Jonker, J. W.; Buitelaar, M.; Wagenaar, E.; Van Der Valk, M. a; Scheffer, G. L.; Scheper, R. J.; Plosch, T.; Kuipers, F.; Elferink, R. P. J. O.; Rosing, H.; Beijnen, J. H.; Schinkel, A. H. (2002) The Breast Cancer Resistance Protein Protects against a Major Chlorophyll-Derived Dietary Phototoxin and Protoporphyrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 15649–15654.
- Jung, K. Y.; Takeda, M.; Shimoda, M.; Narikawa, S.; Tojo, A.; Kim, D. K.; Chairoungdua, A.; Choi, B. K.; Kusuhara, H.; Sugiyama, Y.; Sekine, T.; Endou, H.

- (2002) Involvement of Rat Organic Anion Transporter 3 (rOAT3) in Cephaloridine-Induced Nephrotoxicity: In Comparison with rOAT1. *Life Sci.* **70**: 1861–1874.
- Kaddoumi, A.; Choi, S. U.; Kinman, L.; Whittington, D.; Tsai, C. C.; Ho, R. J. Y.; Anderson, B. D.; Unadkat, J. D. (2007) Inhibition of P-Glycoprotein Activity at the Primate Blood-Brain Barrier Increases the Distribution of Nelfinavir into the Brain but Not into the Cerebrospinal Fluid. *Drug Metab. Dispos.* **35**: 1459–1462.
- Kamiie, J., Ohtsuki, S., Iwase, R. et al. (2008) Quantitative atlas of membrane transporter proteins: development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria. *Pharm Res*, **25**: 1469-1483.
- Kamiie, J.; Ohtsuki, S.; Iwase, R.; Ohmine, K.; Katsukura, Y.; Yanai, K.; Sekine, Y.; Uchida, Y.; Ito, S.; Terasaki, T. (2008) Quantitative Atlas of Membrane Transporter Proteins: Development and Application of a Highly Sensitive Simultaneous LC/MS/MS Method Combined with Novel in-Silico Peptide Selection Criteria. *Pharm. Res.* **25**: 1469–1483.
- Kanai, N., Lu, R., Satriano, J. A., Bao, Y., Wolkoff, A. W. and Schuster, V. L. (1995) Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science*, **268**: 866-869.
- Karakashian, S.; Bayliff, C. D. Niacin-Induced Cystoid Macular Edema. (2001) *Can. J. Hosp. Pharm.* **54**: 35–36.
- Katayama, K.; Ohshima, Y.; Tomi, M.; Hosoya, K. ichi. (2006) Application of Microdialysis to Evaluate the Efflux Transport of Estradiol 17- $\beta$  Glucuronide across the Rat Blood-Retinal Barrier. *J. Neurosci. Methods* **156**: 249–256.
- Keep, R. F. and Smith, D. E. (2011) Choroid plexus transport: gene deletion studies. *Fluids Barriers CNS*, **8**: 26.
- Kitazawa, T., Hosoya, K., Takahashi, T., Sugiyama, Y. and Terasaki, T. (2000) In-vivo and in-vitro evidence of a carrier-mediated efflux transport system for oestrone-3-sulphate across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Pharm Pharmacol*, **52**: 281-288.
- Kitazawa, T., Hosoya, K., Watanabe, M., et al. (2001) Characterization of the amino

- acid transport of new immortalized choroid plexus epithelial cell lines: A novel In Vitro system for investigating transport functions at the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Pharm Res.* **18**: 16–22.
- Klammer, A. A. and MacCoss, M. J. (2006) Effects of Modified Digestion Schemes on the Identification of Proteins from Complex Mixtures. *J Proteome Res.* **5**: 695–700.
- Kodaira, H., Kusuhara, H., Fujita, T., Ushiki, J., Fuse, E. and Sugiyama, Y. (2011) Quantitative evaluation of the impact of active efflux by p-glycoprotein and breast cancer resistance protein at the blood-brain barrier on the predictability of the unbound concentrations of drugs in the brain using cerebrospinal fluid concentration as a surrogate. *J Pharmacol Exp Ther*, **339**: 935-944.
- Kolias, A. G.; Chari, A.; Santarius, T.; Hutchinson, P. J. (2014) Chronic Subdural Haematoma: Modern Management and Emerging Therapies. *Nat. Rev. Neurol.* **10**: 570–578.
- Kuroda, M., Kusuhara, H., Endou, H. and Sugiyama, Y. (2005) Rapid elimination of cefaclor from the cerebrospinal fluid is mediated by a benzylpenicillin-sensitive mechanism distinct from organic anion transporter 3. *J Pharmacol Exp Ther*, **314**: 855-861.
- Kusuhara, H., He, Z., Nagata, Y., et al. (2003) Expression and functional involvement of organic anion transporting polypeptide subtype 3 (Slc21a7) in rat choroid plexus. *Pharm Res.* **20**:720–7.
- Kusuhara, H. and Sugiyama, Y. (2004) Efflux transport systems for organic anions and cations at the blood-CSF barrier. *Adv Drug Deliv Rev*, **56**: 1741-1763.
- Kusuhara, H.; Sekine, T.; Utsunomiya-Tate, N.; Tsuda, M.; Kojima, R.; Cha, S. H.; Sugiyama, Y.; Kanai, Y.; Endou, H. (1999) Molecular Cloning and Characterization of a New Multispecific Organic Anion Transporter from Rat Brain. *J. Biol. Chem.* **274**: 13675–13680.
- Kusuhara, H.; Sugiyama, Y. (2001) Efflux Transport Systems for Drugs at the Blood-Brain Barrier and Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier (Part 2). *Drug Discov.* **6**: 206–212.
- Leggas, M. Adachi, M., Scheffer, G. L., et al. (2004) Mrp4 Confers Resistance to

- Topotecan and Protects the Brain from Chemotherapy Mrp4 Confers Resistance to Topotecan and Protects the Brain from Chemotherapy. *Mol Cell Biol.* **24**:7612–21.
- Leino, R. L.; Gerhart, D. Z.; Drewes, L. R. (1999) Monocarboxylate Transporter (MCT1) Abundance in Brains of Suckling and Adult Rats: A Quantitative Electron Microscopic Immunogold Study. *Dev. Brain Res.* **113**: 47–54.
- Lin, J. (2008) CSF as a Surrogate for Assessing CNS Exposure: An Industrial Perspective. *Curr. Drug Metab.* **9**: 46–59.
- Lindberg, R. L., Martini, R., Baumgartner, M. et al. (1999) Motor neuropathy in porphobilinogen deaminase-deficient mice imitates the peripheral neuropathy of human acute porphyria. *J Clin Invest*, **103**: 1127-1134.
- Liu, C. B., Wang, R., Dong, M. W., Gao, X. R. and Yu, F. (2014) Amyloid-beta transporter expression at the choroid plexus in normal aging: the possibility of reduced resistance to oxidative stress insults. *Sheng Li Xue Bao*, **66**: 158-168.
- Liu, X.; Smith, B. J.; Chen, C.; Callegari, E.; Becker, S. L.; Chen, X.; Cianfrogna, J.; Doran, A. C.; Doran, S. D.; Gibbs, J. P.; Hosea, N.; Liu, J.; Nelson, F. R.; Szewc, M. A.; Van Deusen, J. (2006) Evaluation of Cerebrospinal Fluid Concentration and Plasma Free Concentration as a Surrogate Measurement for Brain Free Concentration. *Drug Metab. Dispos.* **34**: 1443–1447.
- Luckner, P. and Brandsch, M. (2005) Interaction of 31 beta-lactam antibiotics with the H<sup>+</sup>/peptide symporter PEPT2: analysis of affinity constants and comparison with PEPT1. *Eur J Pharm Biopharm*, **59**: 17-24.
- Maeda, T.; Sano, Y.; Abe, M.; Shimizu, F.; Kashiwamura, Y.; Ohtsuki, S.; Terasaki, T.; Obinata, M.; Ueda, M.; Kanda, T. (2013) Establishment and Characterization of Spinal Cord Microvascular Endothelial Cell Lines. *Clin. Exp. Neuroimmunol.* **4**: 326–338.
- Mannermaa, E.; Vellonen, K. S.; Urtti, A. (2006) Drug Transport in Corneal Epithelium and Blood-Retina Barrier: Emerging Role of Transporters in Ocular Pharmacokinetics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**: 1136–1163.
- Mason, B. L., Pariente, C. M., Thomas, S. A. (2008) A revised role for P-glycoprotein in the brain distribution of dexamethasone, cortisol, and corticosterone in

- wild-type and ABCB1A/B-deficient mice. *Endocrinology*. **149**:5244–53.
- Mathur, S. P. (1969) Maculopathy in Pellagra. *Br. J. Ophthalmol.* **53**: 350–351.
- Matsumoto, K.; Chiba, Y.; Fujihara, R.; Kubo, H.; Sakamoto, H.; Ueno, M. (2015) Immunohistochemical Analysis of Transporters Related to Clearance of Amyloid- $\beta$  Peptides through Blood–cerebrospinal Fluid Barrier in Human Brain. *Histochem. Cell Biol.* **144**: 597–611.
- 松前 光紀, 厚見 秀樹, 平山 晃大, 林 直一, 滝沢 賢, 佐野 史弥, 横田 和馬, 反町 隆俊 (2016) 脳脊髄液運動の新知見。 *Neurological Surgery 脳神経外科* **44**: 11.
- Merino, G.; Álvarez, A. I.; Pulido, M. M.; Molina, A. J.; Schinkel, A. H.; Prieto, J. G. (2006) Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp/Abcg2) Transports Fluoroquinolone Antibiotics and Affects Their Oral Availability, Pharmacokinetics, and Milk Secretion. *Drug Metab. Dispos.* **34**: 690–695.
- Milhorat, T. H., Hammock, M. K., Chien, T., Davis, D. A. (1976) Normal rate of cerebrospinal fluid formation five years after bilateral choroid plexectomy: case report. *J Neurosurg* **44**:735-739.
- Milhorat, T. H., Hammock, M. K., Davis, D. A., Fenstermacher, J. D. (1976) Choroid plexus papilloma. I. Proof of cerebrospinal fluid overproduction. *Childs Brain* **2**:273-289.
- Milhorat, T. H., Hammock, M. K., Fenstermacher, J. D., Levin, V. A. (1971) Cerebrospinal fluid production by the choroid plexus and brain. *Science* **173**:330-332.
- Morikawa, N., Mori, T., Kawashima, H., Takeyama, M., Hori, S. (1998) Pharmacokinetics of Anticancer Drugs in Cerebrospinal Fluid. *Ann Pharmacother.* **32**: 1008–1012.
- Muller, W. E. and Snyder, S. H. (1977) delta-Aminolevulinic acid: influences on synaptic GABA receptor binding may explain CNS symptoms of porphyria. *Ann Neurol*, **2**: 340-342.
- Nabeshima, S., Reese, T. S., Landis, D. M., Brightman, M. W. (1975) Junctions in the Meninges and Marginal Glia. *J. Comp. Neurol.* **164**: 127-169.
- Nagata, Y., Kusuhara, H., Endou, H., Sugiyama, Y. (2002) Expression and Functional

- Characterization of Rat Organic Anion Transporter 3 (rOat3) in the Choroid Plexus. *Mol Pharmacol* **61**: 982–988.
- Nagaya, Y., Nozaki, Y., Kobayashi, K., Takenaka, O., Nakatani, Y., Kusano, K., Yoshimura, T., Kusuhara, H. (2014) Utility of Cerebrospinal Fluid Drug Concentration as a Surrogate for Unbound Brain Concentration in Nonhuman Primates. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **29**: 419–426.
- Nakanishi, T. and Tamai, I. (2014) Putative roles of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in cell survival and progression of human cancers. *Biopharm Drug Dispos*, **35**: 463–484.
- Nakayama, H., Kitaichi, K., Ito, Y., et al. (2007) organic cation transporter-3, antisense, methamphetamine, behavioral sensitization, dopamine, drug transport. *Brain Res.* **1184**: 260–269.
- NATHALIE STRAZIELLE AND JEAN-FRANCOIS GHERSI-EGEA. (2000) Choroid Plexus in the Central Nervous System: Biology and Physiopathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **59**: 561–574.
- Nigam, S. K., Wu, W., Bush, K. T., Hoenig, M. P., Blantz, R. C., Bhatnagar, V. (2015) Handling of Drugs, Metabolites, and Uremic Toxins by Kidney Proximal Tubule Drug Transporters. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **10**: 2039–2049.
- Niwa, T. (2011) Uremic Toxicity of Indoxyl Sulfate. *Nagoya J. Med. Sci.* **72**: 1–11.
- Nolte, J., Meningeal Coverings of the Brain and Spinal Cord. In THE HUMAN BRAIN An Introduction to Its Functional Anatomy, 6th ed.; Hyde, M., DeFrancesco, K., Eds.; Mosby: St. Louis County, 2008; pp 80–98
- Nurdin, A.; Hoshi, Y.; Yoneyama, T.; Miyauchi, E.; Tachikawa, M.; Watanabe, M.; Terasaki, T. (2016) Global and Targeted Proteomics of Prostate Cancer Cell Secretome: Combination of 2-Dimensional Image-Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry and In Silico Selection Selected Reaction Monitoring Analysis. *J. Pharm. Sci.* **105**: 3440–3452.
- Ocheltree, S. M., Shen, H., Hu, Y., et al. (2004) Mechanisms of cefadroxil uptake in the choroid plexus: studies in wild-type and PEPT2 knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther.* **308**: 462–7.
- Ohkura, Y.; Akanuma, S. ichi; Tachikawa, M.; Hosoya, K. ichi. (2010) Blood-to-Retina

- Transport of Biotin via Na<sup>+</sup>-Dependent Multivitamin Transporter (SMVT) at the Inner Blood-Retinal Barrier. *Exp. Eye Res.* **91**: 387–392.
- Ohtsuki, S., Asaba, H., Takanaga, H., Deguchi, T., Hosoya, K., Otagiri, M. and Terasaki, T. (2002) Role of blood-brain barrier organic anion transporter 3 (OAT3) in the efflux of indoxyl sulfate, a uremic toxin: its involvement in neurotransmitter metabolite clearance from the brain. *J Neurochem*, **83**: 57-66.
- Ohtsuki, S., Ikeda, C., Uchida, Y. et al. (2013) Quantitative targeted absolute proteomic analysis of transporters, receptors and junction proteins for validation of human cerebral microvascular endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model. *Mol Pharm*, **10**: 289-296.
- Ohtsuki, S., Schaefer, O., Kawakami, H. et al. (2012) Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. *Drug Metab Dispos*, **40**: 83-92.
- Ohtsuki, S., Uchida, Y., Kubo, Y. and Terasaki, T. (2011) Quantitative targeted absolute proteomics-based ADME research as a new path to drug discovery and development: methodology, advantages, strategy, and prospects. *J Pharm Sci*, **100**: 3547-3559.
- Ohtsuki, S.; Ikeda, C.; Uchida, Y.; Sakamoto, Y.; Miller, F.; Glacial, F.; Decleves, X.; Scherrmann, J. M.; Couraud, P. O.; Kubo, Y.; Tachikawa, M.; Terasaki, T. (2013) Quantitative Targeted Absolute Proteomic Analysis of Transporters, Receptors and Junction Proteins for Validation of Human Cerebral Microvascular Endothelial Cell Line hCMEC/D3 as a Human Blood-Brain Barrier Model. *Mol. Pharm.* **10**: 289–296.
- Ohtsuki, S.; Schaefer, O.; Kawakami, H.; Inoue, T.; Liehner, S.; Sato, A.; Ishiguro, N.; Kishimoto, W.; Ludwig-Schwellinger, E.; Ebner, T.; Terasaki, T. (2011) Simultaneous Absolute Protein Quantification of Transporters, Cytochrome P450s and UDP-Glucuronosyltransferases as a Novel Approach for the Characterization of Individual Human Liver: Comparison with mRNA Levels and Activities. *Drug Metab. Dispos.* **40**: 83–92.



- Ohtsuki, S., Takizawa, T., Takanaga, H., et al. (2003) In vitro study of the functional expression of organic anion transporting polypeptide 3 at rat choroid plexus epithelial cells and its involvement in the cerebrospinal fluid-to-blood transport of estrone-3-sulfate. *Mol Pharmacol.* **63**: 532–7.
- Ohtsuki, S., Takizawa, T., Takanaga, H., et al. (2004) Localization of organic anion transporting polypeptide 3 (oatp3) in mouse brain parenchymal and capillary endothelial cells. *J Neurochem.* **90**: 743–9.
- Oreškovic, D., Klarica, M. (2010) The formation of cerebrospinal fluid : nearly a hundred years of interpretations and misinterpretations. *Brain Res Rev* **64**: 241-262
- Ostermann, S. (2004) Plasma and Cerebrospinal Fluid Population Pharmacokinetics of Temozolomide in Malignant Glioma Patients. *Clin. Cancer Res.* **10**: 3728–3736.
- Otsuka, M., Matsumoto, T., Morimoto, R., Arioka, S., Omote, H. and Moriyama, Y. (2005) A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**: 17923-17928.
- Prince, J.H., Diesem, C.D., Eglitis, I., Ruskell, G.L. The pig. In: Anatomy and Histology of the Eye and Orbit in Domestic Animals, Thomas, C.C. Eds., Charles C. Thomas Publisher LTD: Springfield, 1960; pp 210–230.
- Proc, J. L.; Kuzyk, M. A.; Hardie, D. B.; Yang, J.; Smith, D. S.; Jackson, A. M.; Parker, C. E.; Borchers, C. H. (2010) A Quantitative Study of the Effects of Chaotropic Agents, Surfactants, and Solvents on the Digestion Efficiency of Human Plasma Proteins by Trypsin Jennifer. *J. Proteome Res.***9**: 5422–5437.
- Radford, D. J., Wang, K., McNelis, J. C., Taylor, A. E., Hechenberger, G., Hofmann, J., Chahal, H., Arlt, W. and Lord, J. M. (2010) Dehydroepiandrosterone sulfate directly activates protein kinase C-beta to increase human neutrophil superoxide generation. *Mol Endocrinol*, **24**: 813-821.
- Ramirez, C. J.; Minch, J. D.; Gay, J. M.; Lahmers, S. M.; Guerra, D. J.; Haldorson, G. J.; Schneider, T.; Mealey, K. L. (2011) Molecular Genetic Basis for Fluoroquinolone-Induced Retinal Degeneration in Cats. *Pharmacogenet. Genomics* **21**: 66–75.
- Ramirez-Bermudez, J.; Ruiz-Chow, A.; Perez-Neri, I.; Soto-Hernandez, J. L.;

- Flores-Hernandez, R.; Nente, F.; Montes, S.; Rios, C. (2008) Cerebrospinal Fluid Homovanillic Acid Is Correlated to Psychotic Features in Neurological Patients with Delirium. *Gen. Hosp. Psychiatry* **30**: 337–343.
- Rao, V. V.; Dahlheimer, J. L.; Bardgett, M. E.; Snyder, A. Z.; Finch, R. A.; Sartorelli, A. C.; Piwnica-Worms, D. (2011) Choroid Plexus Epithelial Expression of MDR1 P Glycoprotein and Multidrug Resistance-Associated Protein Contribute to the Blood-Cerebrospinal-Fluid Drug-Permeability Barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 3900–3905.
- Redzic, Z. (2011) Molecular Biology of the Blood-Brain and the Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers: Similarities and Differences. *Fluids Barriers CNS* **8**: 3.
- Roberts, L. M., Black, D. S., Raman, C., et al. (2008) Subcellular localization of transporters along the rat blood-brain barrier and blood-cerebral-spinal fluid barrier by in vivo biotinylation. *Neuroscience*. **155**: 423–38.
- Roberts, L. M., Woodford, K., Zhou, M., et al. (2008) Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier. *Endocrinology*. **149**: 6251–61.
- Roberts, J. E. (2001) Ocular Phototoxicity. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **64**: 136–143.
- Rolinson, G. N. and Sutherland, R. (1965) The binding of antibiotics to serum proteins. *Br J Pharmacol Chemother*, **25**: 638-650.
- Rousselle, C., Clair, P., Temsamani, J. and Scherrmann, J. M. (2002) Improved brain delivery of benzylpenicillin with a peptide-vector-mediated strategy. *J Drug Target*, **10**: 309-315.
- Ruiz-Ederra, J.; García, M.; Hernández, M.; Urcola, H.; Hernández-Barbáchano, E.; Araiz, J.; Vecino, E. (2005) The Pig Eye as a Novel Model of Glaucoma. *Exp. Eye Res.* **81**: 561–569.
- Saboori, P.; Sadegh, A. (2015) Histology and Morphology of the Brain Subarachnoid Trabeculae. *Anat. Res. Int.* 1–9.
- Sakamoto, A.; Suzuki, S.; Matsumaru, T.; Yamamura, N.; Uchida, Y.; Tachikawa, M.; Terasaki, T. (2016) Correlation of Organic Cation/Carnitine Transporter 1 and

- Multidrug Resistance-Associated Protein 1 Transport Activities with Protein Expression Levels in Primary Cultured Human Tracheal, Bronchial, and Alveolar Epithelial Cells. *J. Pharm. Sci.* **405**: 876–883.
- Schoots, A. C.; De Vries, P. M.; Thiemann, R.; Hazejager, W. A.; Visser, S. L.; Oe, P. L. (1989) Biochemical and Neurophysiological Parameters in Hemodialyzed Patients with Chronic Renal Failure. *Clin. Chim. Acta.* **185**: 91–107.
- Sekine, T.; Watanabe, N.; Hosoyamada, M.; Kanai, Y.; Endou, H. (1997) Expression Cloning and Characterization of a Novel Multispecific Organic Anion Transporter. *J. Biol. Chem.* **272**: 18526–18529.
- Shawahna, R.; Uchida, Y.; Declèves, X.; Ohtsuki, S.; Yousif, S.; Dauchy, S.; Jacob, A.; Chassoux, F.; Dumas-Duport, C.; Couraud, P.-O.; Terasaki, T.; Scherrmann, J.-M. (2011) Transcriptomic and Quantitative Proteomic Analysis of Transporters and Drug Metabolizing Enzymes in Freshly Isolated Human Brain Microvessels. *Mol. Pharm.* **8**: 1332–1341.
- Shen, D. D.; Artru, A. A.; Adkison, K. K. (2004) Principles and Applicability of CSF Sampling for the Assessment of CNS Drug Delivery and Pharmacodynamics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**: 1825–1857.
- Shen, H., Smith, D. E., Keep, R. F. and Brosius, F. C., 3rd (2004) Immunolocalization of the proton-coupled oligopeptide transporter PEPT2 in developing rat brain. *Mol Pharm*, **1**: 248-256.
- Shen, J.; Carcaboso, A. M.; Hubbard, K. E.; Tagen, M.; Wynn, H. G.; Panetta, J. C.; Waters, C. M.; Elmeliegy, M. A.; Stewart, C. F. (2010) Compartment-Specific Roles of ABC Transporters Define Differential Distribution in Brain Parenchyma and Cerebrospinal Fluid. *Cancer Res.* **69**: 5885–5892.
- Simanjuntak, M. T.; Tamai, I.; Terasaki, T.; Tsuji A. (1990) Carrier-Mediated Uptake of Nicotinic Acid By Rat Intestinal Brush-Border Membrane Vesicles and Relation to Monocarboxylic Acid Transport. *J. Pharmacobio-Dyn.* **13**: 301-309
- Simoens, P.; Schaepdrijver, L. D.; Lauwers, H. (1992) Morphologic Miniature and Clinical Study of the Retinal Pig. A : Morphology of the Retinal Circulation in the Microvasculature. *Exp. Eye. Res.* **54**: 965-973.
- Smith, D. E., Hu, Y., Shen, H., Nagaraja, T. N., Fenstermacher, J. D. and Keep, R. F.

- (2011) Distribution of glycylsarcosine and cefadroxil among cerebrospinal fluid, choroid plexus, and brain parenchyma after intracerebroventricular injection is markedly different between wild-type and Pept2 null mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, **31**: 250-261.
- Spector, R. and Johanson, C. E. (2010) Vectorial ligand transport through mammalian choroid plexus. *Pharm Res*, **27**: 2054-2062.
- Spector, R.; Johanson, C. E. (1989) The Mammalian Choroid Plexus. *Sci. Am.* **261**: 68–74.
- Spector, R.; Johanson, C. E. (2007) Vitamin Transport and Homeostasis in Mammalian Brain: Focus on Vitamins B and E. *J. Neurochem.* **103**: 425–438.
- Strazielle N. and Gherzi-Egea J. F. (2000) Choroid Plexus in the Central Nervous System : Biology and Physiopathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **59**: 561–574.
- Strazielle, N. and Gherzi-Egea, J. F. (2000) Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. *J Neuropathol Exp Neurol*, **59**: 561-574.
- Sullivan, G. M., Hatterer, J. A., Herbert, J. et al. (1999) Low levels of transthyretin in the CSF of depressed patients. *Am J Psychiatry*, **156**: 710-715.
- Suzuki, H.; Sawada, Y.; Sugiyama, Y.; Iga, T.; Hanano, M. (1985) Saturable Transport of Cimetidine from Cerebrospinal Fluid to Blood in Rats. *J. Pharmacobiodyn.* **8**: 73–76.
- Sweet, D. H., Miller, D. S., Pritchard, J. B., et al. (2002) Impaired organic anion transport in kidney and choroid plexus of organic anion transporter 3 (Oat3 (Slc22a8)) knockout mice. *J Biol Chem.* 277(30):26934–43.
- Tachibana, T., Kitamura, S., Kato, M., Mitsui, T., Shirasaka, Y., Yamashita, S. and Sugiyama, Y. (2010) Model analysis of the concentration-dependent permeability of P-gp substrates. *Pharm Res*, **27**: 442-446.
- Tachikawa, M., Fujinawa, J., Takahashi, M., et al. (2008) Expression and possible role of creatine transporter in the brain and at the blood-cerebrospinal fluid barrier as a transporting protein of guanidinoacetate, an endogenous convulsant. *J Neurochem.* **107**:768–78.
- Tachikawa, M., Hosoya, K., Terasaki, T. (2014) Pharmacological significance of

- prostaglandin E<sub>2</sub> and D<sub>2</sub> transport at the brain barriers. *Advances in Pharmacology*. 71:337-360.
- Tachikawa, M., Kasai, Y., Takahashi, M., Fujinawa, J., Kitaichi, K., Terasaki, T. and Hosoya, K. (2008) The blood-cerebrospinal fluid barrier is a major pathway of cerebral creatinine clearance: involvement of transporter-mediated process. *J Neurochem*, **107**: 432-442.
- Tachikawa, M., Ozeki, G., Higuchi, T., Akanuma, S., Tsuji, K. and Hosoya, K. (2012) Role of the blood-cerebrospinal fluid barrier transporter as a cerebral clearance system for prostaglandin E(2) produced in the brain. *J Neurochem*, **123**: 750-760.
- Tachikawa, M.; Murakami, K.; Martin, P. M.; Hosoya, K. I.; Ganapathy, V. (2011) Retinal Transfer of Nicotinate by H<sup>+</sup>-Monocarboxylate Transporter at the Inner Blood-Retinal Barrier. *Microvasc. Res.* **82**: 385–390.
- Tachikawa, M.; Obuchi, W.; Hoshi, Y.; Tomioka, Y.; Ohtsuki, S.; Terasaki, T. (2013) A Study Protocol for Quantitative Targeted Absolute Proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: Application for Inter-Strain Differences in Protein Expression Levels of Transporters, Receptors, Claudin-5, and Marker Proteins at the Blood--Brain Barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice. *Fluids Barriers CNS* **10**: 21.
- Tachikawa, M.; Ozeki, G.; Higuchi, T.; Akanuma, S. I.; Tsuji, K.; Hosoya, K. I. (2012) Role of the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Transporter as a Cerebral Clearance System for Prostaglandin E<sub>2</sub> Produced in the Brain. *J. Neurochem.* **123**: 750–760.
- Tachikawa, M.; Tsuji, K.; Yokoyama, R.; Higuchi, T.; Ozeki, G.; Yashiki, A.; Akanuma, S.; Hayashi, K.; Nishiura, A.; Hosoya, K. (2012) A Clearance System for Prostaglandin D<sub>2</sub>, a Sleep-Promoting Factor, in Cerebrospinal Fluid: Role of the Blood-Cerebrospinal Barrier Transporters. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **343**: 608–616.
- Tachikawa, M.; Watanabe, M.; Hori, S.; Fukaya, M.; Ohtsuki, S.; Asashima, T.; Terasaki, T. (2005) Distinct Spatio-Temporal Expression of ABCA and ABCG Transporters in the Developing and Adult Mouse Brain. *J. Neurochem.* **95**: 294–304.
- Takasawa, K.; Terasaki, T.; Suzuki, H.; Ooie, T.; Sugiyama, Y. (1997) Distributed Model Analysis of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxyinosine Distribution in

- Brain Tissue and Cerebrospinal Fluid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **282**: 1509–1517.
- Tanihara, Y., Masuda, S., Sato, T., Katsura, T., Ogawa, O. and Inui, K. (2007) Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H(+)-organic cation antiporters. *Biochem Pharmacol*, **74**: 359-371.
- Terada, T., Masuda, S., Asaka, J., Tsuda, M., Katsura, T. and Inui, K. (2006) Molecular cloning, functional characterization and tissue distribution of rat H+/organic cation antiporter MATE1. *Pharm Res*, **23**: 1696-1701.
- Teuscher, N. S., Novotny, A., Keep, R. F., Smith, D. E. (2000) Functional evidence for presence of PEPT2 in rat choroid plexus: studies with glycylsarcosine. *J Pharmacol Exp Ther.* **294**: 494–9.
- Thorne, R. G. Appendix Primer on Central Nervous System Structure/Function and the Vasculature, Ventricular System, and Fluids of the Brain. In Drug Delivery to the Brain: Physiological Concepts, Methodologies and Approaches. Hammarlund-Udenaes, M., de Lange, E. C. M, Thorne, R. G., Eds.; Springer.: New York, 2014; pp705
- Tomi, M.; Hosoya, K. (2004) Application of Magnetically Isolated Rat Retinal Vascular Endothelial Cells for the Determination of Transporter Gene Expression Levels at the Inner Blood-Retinal Barrier. *J. Neurochem.* **91**: 1244–1248.
- Tsuji, A.; Saheki, A.; Tamai, I.; Terasaki, T. (1993) Transport Mechanism of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors at the Blood-Brain Barrier. *J Pharmacol Exp Ther* **267**: 1085–1090.
- Tsuruoka, S., Ishibashi, K., Yamamoto, H., Wakaumi, M., Suzuki, M., Schwartz, G. J., Imai, M. and Fujimura, A. (2002) Functional analysis of ABCA8, a new drug transporter. *Biochem Biophys Res Commun*, **298**: 41-45.
- Uchida, Y., Kamiie, J., Ohtsuki, S. and Terasaki, T. (2007) Multichannel liquid chromatography-tandem mass spectrometry cocktail method for comprehensive substrate characterization of multidrug resistance-associated protein 4 transporter. *Pharm Res*, **24**: 2281-2296.
- Uchida, Y., Ohtsuki, S., Katsukura, Y., Ikeda, C., Suzuki, T., Kamiie, J. and Terasaki, T. (2011) Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem*, **117**: 333-345.

- Uchida, Y., Tachikawa, M., Obuchi, W., Hoshi, Y., Tomioka, Y., Ohtsuki, S. and Terasaki, T. (2013) A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: application for inter-strain differences in protein expression levels of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood-brain barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice. *Fluids Barriers CNS*, **10**: 21.
- Uchida, Y., Wakayama, K., Ohtsuki, S., Chiba, M., Ohe, T., Ishii, Y. and Terasaki, T. (2014) Blood-brain barrier pharmacoproteomics-based reconstruction of the in vivo brain distribution of P-glycoprotein substrates in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, **350**: 578-588.
- Uchida, Y.; Ohtsuki, S.; Katsukura, Y.; Ikeda, C.; Suzuki, T.; Kamiie, J.; Terasaki, T. (2011) Quantitative Targeted Absolute Proteomics of Human Blood-Brain Barrier Transporters and Receptors. *J. Neurochem.* **117**: 333–345.
- Uchida, Y.; Zhang, Z.; Tachikawa, M.; Terasaki, T. (2015) Quantitative Targeted Absolute Proteomics of Rat Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Transporters: Comparison with a Human Specimen. *J. Neurochem.* **134**: 1104–1115.
- Uhr, M., Holsboer, F., Müller, M. B. (2002) Penetration of endogenous steroid hormones corticosterone, cortisol, aldosterone and progesterone into the brain is enhanced in mice deficient for both *mdr1a* and *mdr1b* P-glycoproteins. *J Neuroendocrinol.* **14**:753–9.
- Urquhart, B. L., Kim, R. B. (2009) Blood-brain barrier transporters and response to CNS-active drugs. *Eur J Clin Pharmacol.* **65**:1063–70.
- Vadlapudi, A. D.; Vadlapatla, R. K.; Kwatra, D.; Earla, R.; Samanta S. K.; Pal, D.; Mitra, A. K. (2012) Targeted lipid based drug conjugates: a novel strategy for drug delivery. *Int. J. Pharm.* **434**: 315-24.
- Vadlapudi, A. D.; Vadlapatla, R. K.; Mitra, A. K. (2012) Sodium Dependent Multivitamin Transporter (SMVT): A Potential Target for Drug Delivery. *Curr. Drug Targets* **13**: 994–1003.
- Vandenabeele, F.; Creemers, J.; Lambrechts, I. (1996) Ultrastructure of the Human Spinal Arachnoid Mater and Dura Mater. *J. Anat.* **189**: 417–430.
- VanEssen, D. C.; Drury, H. (1997) Structural and Functional Analyses of Human

- Cerebral Cortex Using a Surface-Based Atlas. *J. Neurosci.* **17**: 7079–7102.
- Wang, J. (2016) The plasma membrane monoamine transporter (PMAT): Structure, function, and role in organic cation disposition. *Clin Pharmacol Ther.* **100**: 489–99.
- Weller, R. O., Subash, M., Preston, S. D., Mazanti, I., Carare, R. O. (2008) Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease *Brain Pathol* **18**: 253-266
- Weller, R. O., Djuanda, E., Yow, H. Y., Carare, R. O. (2009) Lymphatic drainage of the brain and the pathophysiology of neurological disease. *Acta Neuropathol* **117**:1-14.
- Weller, R. O., Galea, I., Carare, R. O., Minagar, A. (2010) Pathophysiology of the lymphatic drainage of the central nervous system : implications for pathogenesis and therapy of multiple sclerosis. *Pathophysiology* **17**: 295-306.
- Wiebe, V.; Pharm, D.; Hamilton, P. (2000) Topics in Drug Therapy Retinal Degeneration in Cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **221**: 1568-1571.
- Wijnholds, J.; Lange, E. C. M. De; Scheffer, G. L.; Berg, D. Van Den; Mol, C. A. A. M.; Valk, M. Van Der; Schinkel, A. H.; Scheper, R. J.; Breimer, D. D.; Borst, P. (2000) Multidrug Resistance Protein 1 Protects the Choroid Plexus Epithelium and Contributes to the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier. *J Clin Invest.* **105**: 279–285.
- Williams, A. C. and Ramsden, D. B. (2005) Autotoxicity, methylation and a road to the prevention of Parkinson's disease. *J Clin Neurosci*, **12**: 6-11.
- Williams, M. J., Lowrie, M. B., Bennett, J. P., Firth, J. A. and Clark, P. (2005) Cadherin-10 is a novel blood-brain barrier adhesion molecule in human and mouse. *Brain Res*, **1058**: 62-72.
- Yasuda, K.; Cline, C.; Vogel, P.; Onciu, M.; Fatima, S.; Sorrentino, B. P.; Thirumaran, R. K.; Ekins, S.; Urade, Y.; Fujimori, K.; Schuetz, E. G. (2013) Drug Transporters on Arachnoid Barrier Cells Contribute to the Blood – Cerebrospinal Fluid Barrier. *Drug Metab. Dispos.* **41**: 923–931.
- Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiagarajan M, O'Donnell J, Christensen DJ, Nicholson C, Iliff JJ, Takano T, Deane R, Nedergaard M. (2013) Sleep drives



- metabolite clearance from the adult brain. *Science*. **342**: 373-377.
- Yee, S. W., Nguyen, A. N., Brown, C. et al. (2013) Reduced renal clearance of cefotaxime in asians with a low-frequency polymorphism of OAT3 (SLC22A8). *J Pharm Sci*, **102**: 3451-3457.
- Zhang L.; Ong W. Y.; Lee T. (1999) Induction of P-Glycoprotein Expression in Astrocytes Following Intracerebroventricular Kainate Injections. *Exp. Brain Res*. **126**: 509–516.
- Zhang, W.; Mojsilovic-petrovic, J.; Andrade, M. F.; Zhang, H.; Ball, M.; Stanimirovic, D. B. (2003) Expression and Functional Characterization of ABCG2 in Brain Endothelial Cells and Vessels. *FASEB J*. **17**: 2085–2087.
- Zhang, Z.; Uchida, Y.; Hirano, S.; Ando, D.; Kubo, Y.; Auriola, S.; Akanuma, S.; Hosoya, K.; Urtti, A.; Terasaki, T.; Tachikawa, M. (2017) Inner blood-retinal barrier dominantly expresses breast cancer resistance protein: Comparative quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) study of CNS barriers in pig. *Mol Pharm*. **14**: 3729-3738
- Zhong, M., Molday, L. L. and Molday, R. S. (2009) Role of the C terminus of the photoreceptor ABCA4 transporter in protein folding, function, and retinal degenerative diseases. *J Biol Chem*, **284**: 3640-3649.

## 発表論文

本博士論文の一部は、以下の原著論文を基に作成されたものである。

Uchida, Y.; Zhang, Z.; Tachikawa, M.; Terasaki, T. (2015) Quantitative Targeted Absolute Proteomics of Rat Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Transporters: Comparison with a Human Specimen. *J. Neurochem.* **134**: 1104–1115.

Zhang, Z.; Uchida, Y.; Hirano, S.; Ando, D.; Kubo, Y.; Auriola, S.; Akanuma, S.; Hosoya, K.; Urtti, A.; Terasaki, T.; Tachikawa, M. (2017) Inner blood-retinal barrier dominantly expresses breast cancer resistance protein: Comparative quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) study of CNS barriers in pig. *Mol Pharm.* **14**: 3729-3738

Zhang, Z., Uchida, Y., Tachikawa, M., Terasaki, T. Drug clearance from cerebrospinal fluid mediated by organic anion transporters 1 (Slc22a6) and 3 (Slc22a8) at arachnoid membrane of rats”, *Molecular Pharmaceutics*, (2017 年 12 月 revise 中)

## 謝辞

本研究において、終始御指導と御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科 薬物送達学分野 教授 寺崎哲也 先生に謹んで感謝致します。

本論文の審査にあたり、有益な御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科 薬理学分野 教授 福永浩司 先生、並びに同衛生化学分野 教授 松沢厚 先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり終始有益な御指導と御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科 薬物送達学分野 准教授 立川正憲 先生、同助教 内田康雄 先生、並びに渡部通寿先生に心より感謝致します。

本研究に用いたブタ網膜毛細血管及び色素上皮細胞粗膜画分を提供して頂いた富山大学大学院薬学研究科 教授 細谷健一 先生、准教授 久保義行 先生、同助教 赤沼伸乙 先生に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり活発に議論して下さい多くの貴重な御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科 薬物送達学分野 卒業生 小湊航 博士、同卒業生 金子洋介 博士、同卒業生 赤澤貴憲 氏、同卒業生 米山敏広 博士、同卒業生 星裕太朗 博士、同卒業生 落合祐介 氏、同卒業生 武藤健吾 氏、に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行に際して多大なる御協力と御配慮を頂きました東北大学大学院薬学研究科 薬物送達学分野 黒田広樹 氏、佐藤和樹 氏、宮内英輔 氏に心よ

り感謝致します。

本研究全般にわたり多大なる御協力とご配慮を頂きました新冨亜希子 氏、飯田尚子 氏をはじめとする東北大学大学院薬学研究科 薬物送達学分野の皆様方、並びに卒業生の方々に厚く御礼申し上げます。

最後に、長年にわたり多大なる援助と激励を下さいました家族に心より感謝致します。

平成30 年 3 月

張 正宇